[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780003005.8

[43] 公开日 2010 年 1 月 27 日

[11] 公开号 CN 101636178A

[22] 申请日 2007.1.9
[21] 申请号 200780003005.8
[30] 优先权
[32] 2006. 1.13 [33] FR [31] 0600309
[86] 国际申请 PCT/FR2007/000030 2007.1.9
[87] 国际公布 WO2007/080308 法 2007.7.19
[85] 进入国家阶段日期 2008.7.11
[71] 申请人 赛诺菲巴斯德有限公司
地址 法国里昂
[72] 发明人 M·-F·克卢克 J·海恩斯勒
P·普罗贝克-奎莱 P·乔克斯
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘维升 段家荣
权利要求书 10 页 说明书 37 页

[54] 发明名称

热可逆水包油乳液

[57] 摘要

本发明涉及一种热可逆水包油(O/W)乳液形式的免疫刺激组合物，它包含化学结构不含糖环的TLR4 兴奋剂，属于聚氧乙烯烷基醚化学类别的非离子表面活性剂、亲水表面活性剂和含水溶剂，它表现出免疫刺激性质。

1. 一种水包油（O/W）乳液，包含:

i）TLR4 兴奋剂，称作 TLA4，其化学结构不包含糖环，

ii）角鲨烯，

iii）含水溶剂，

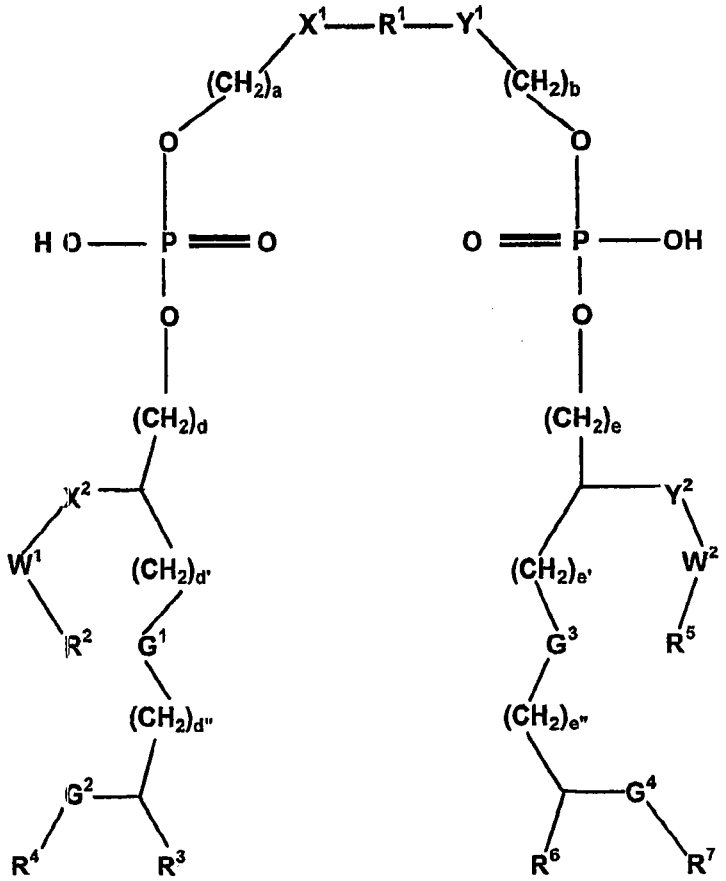
iv）非离子亲水表面活性剂其是聚氧乙烯烷基醚，

v）非离子疏水表面活性剂，并且

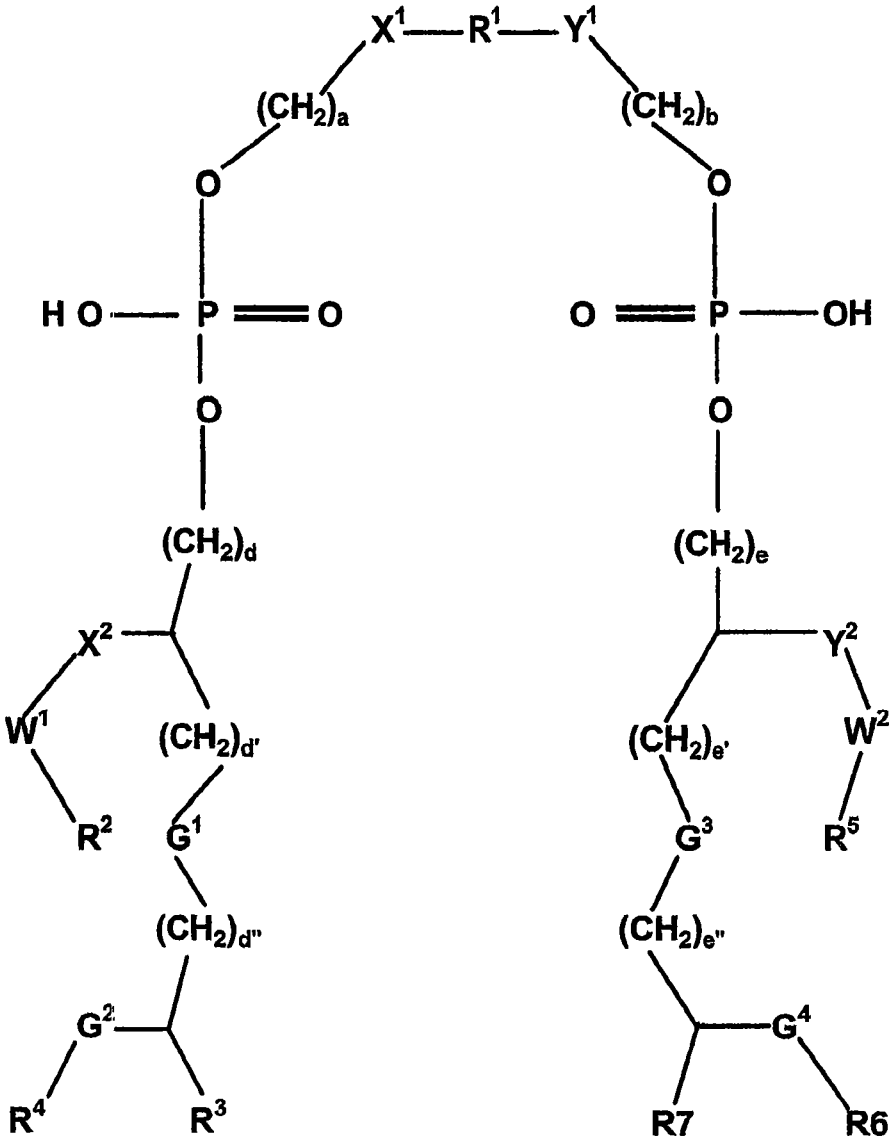
它是热可逆的。

2. 权利要求 1 的乳液，其中 TLA4 是通式 I，II，III 或 IV 的化学化合物:

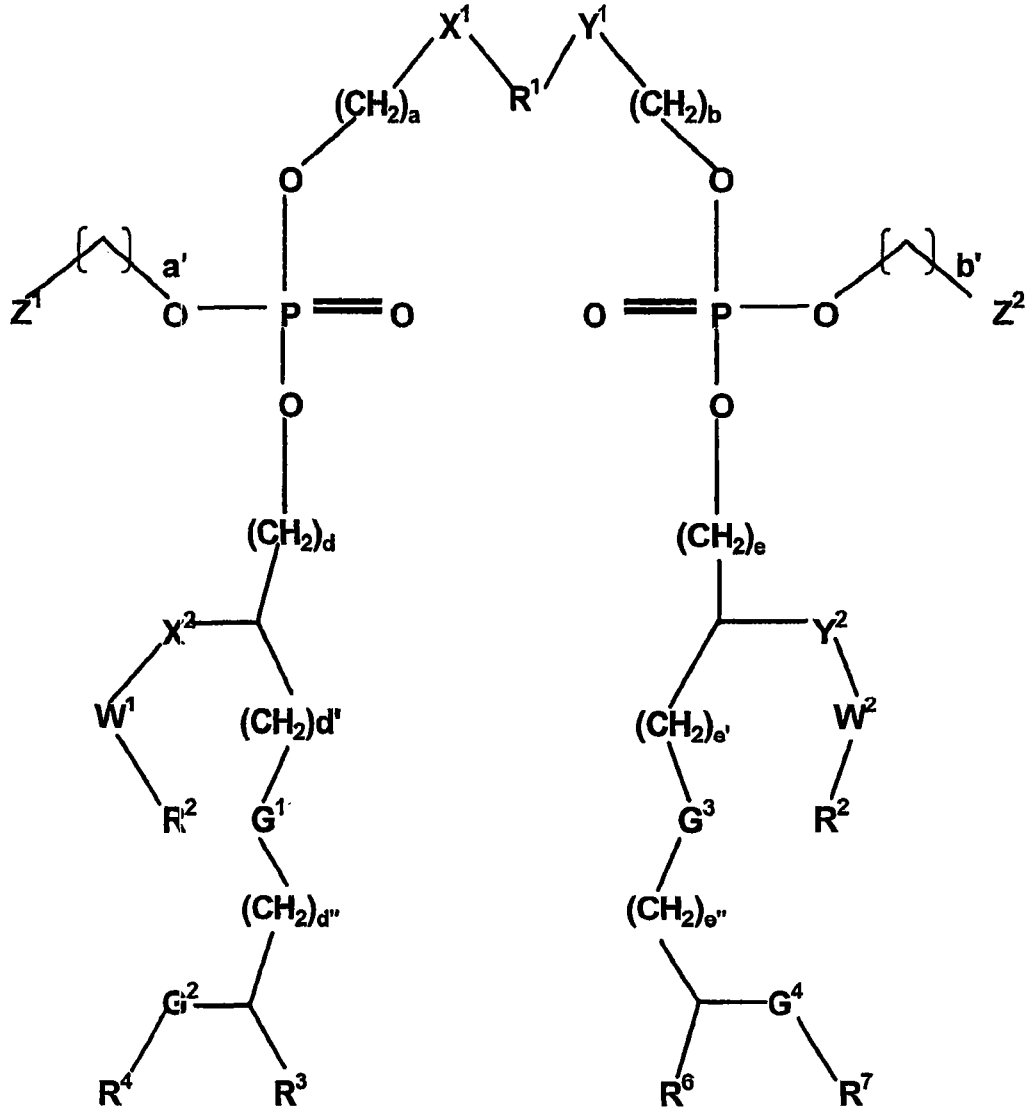
通式 I 的化合物



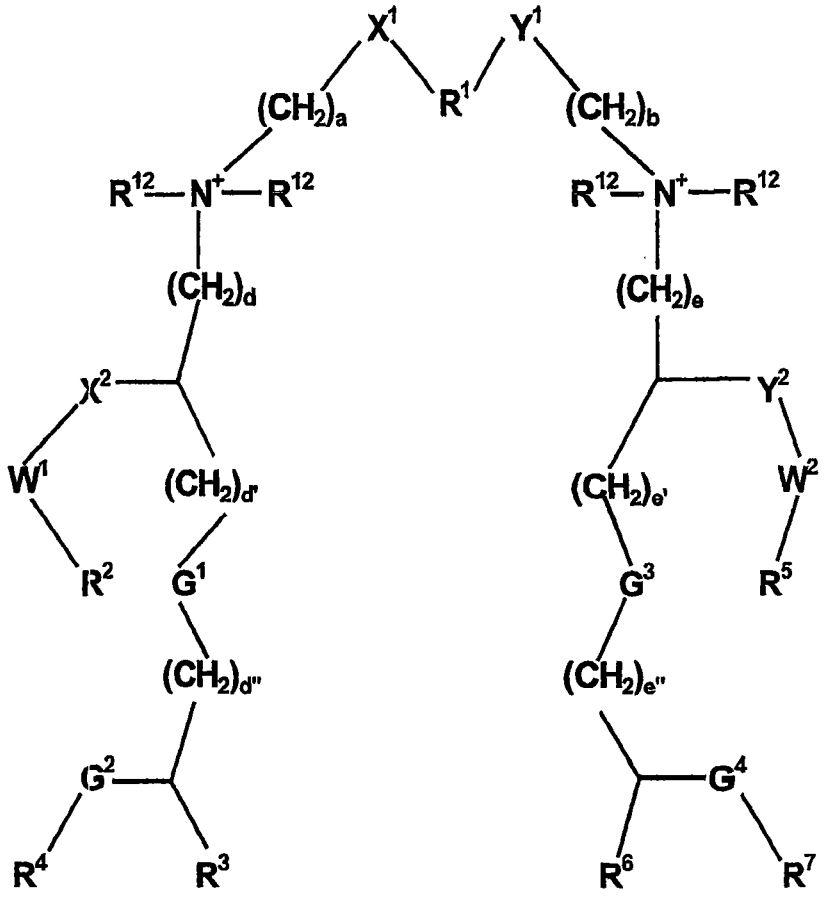
通式II的化合物



通式 III 的化合物



通式 IV 的化合物



其中，就通式 I，II，III 或 IV 每一个而言，R^1 选自：

a）C（O）；

b）C（O）-（C_1-C_{14} 烷基）-C（O），其中所述 C_1-C_{14} 烷基任选地取代上羟基，C_1-C_5 烷氧基，C_1-C_5 亚烷基二氧基，（C_1-C_5 烷基）氨基或（C_1-C_5 烷基）芳基，其中所述（C_1-C_5 烷基）芳基的芳基部分任选地取代上 C_1-C_5 烷氧基，（C_1-C_5 烷基）氨基，（C_1-C_5 烷氧基）氨基，（C_1-C_5 烷基）氨基（C_1-C_5 烷氧基），-O-（C_1-C_5 烷基）氨基（C_1-C_5 烷氧基），-O-（C_1-C_5 烷基）氨基-C（O）-（C_1-C_5 烷基）-C（O）OH，或-O-（C_1-C_5 烷基）氨基-C（O）-（C_1-C_5 烷基）-C（O）-（C_1-C_5）烷基；

c）含有 C_2-C_{15} 线型或支化链的烷基，任选地取代上羟基或烷氧基；以及

d）-C（O）-（C_6-C_{12} 亚芳基）-C（O）-，其中所述亚芳基任选地取代上羟基，卤素，硝基或氨基；

a 和 b 独立地是 0，1，2，3 或 4;

d，d'，d''，e，e'和 e''独立地是 0，1，2，3 或 4;

X^1，X^2，Y^1 和 Y^2 独立地选自空位，氧，NH 和 N（C（O）（C_1-C_4 烷基）），和 N（C_1-C_4 烷基）;

W^1 和 W^2 独立地选自羰基，亚甲基，砜和亚砜;

R^2 和 R^5 独立地选自:

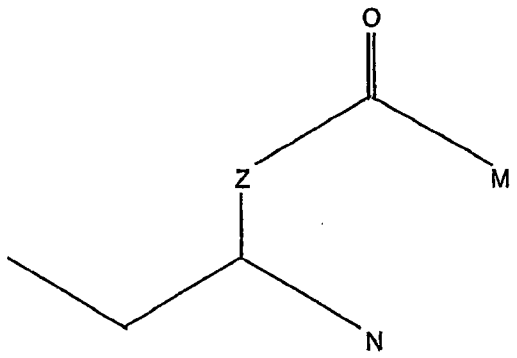
a）C_2 to C_{20} 直链或支化链烷基，其任选地取代上氧代，羟基或烷氧基;

b）C_2 to C_{20} 直链或支化链烯基或二烯基，其任选地取代上氧代，羟基或烷氧基;

c）C_2 to C_{20} 直链或支化链烷氧基，其任选地取代上氧代，羟基或烷氧基;

d）NH-（C_2 to C_{20} 直链或支化链烷基），其中所述烷基基团任选地取代上氧代，羟基或烷氧基；和

e）



其中 Z 选自 O 和 NH，而 M 和 N 独立地选自烷基，烯基，烷氧基，酰氧基，烷基氨基和酰基氨基，其包含 C_2-C_{20} 线型或支化链;

R^3 和 R^6 独立地选自 C_2 to C_{20} 直链或支化链烷基或烯基，其任选地取代上氧代或氟;

R^4 和 R^7 独立地选自 C（O）-（C_2 to C_{20} 直链或支化链烷基或烯基），C_2 to C_{20} 直链或支化链烷基，C_2 to C_{20} 直链或支化链烷氧基，和 C_2 to C_{20} 直链或支化链烯基；其中所述烷基，烯基或烷氧基基团可独立地并任选地取代上羟基，氟或 C_1-C_5 烷氧基;

G_1，G_2，G_3 和 G_4 独立地选自氧，亚甲基，氨基，硫醇，-C（O）

NH-，-NHC（O）-，和-N（C（O）（C_1-C_4烷基））-；

或 G^2R^4 或 G^4R^7 可合在一起是氢原子或羟基；

且其中就通式 III 而言：

a'和 b'独立地是 2，3，4，5，6，7 或 8，优选 2；

Z^1 选自-OP（O）（OH）$_2$，-P（O）（OH）$_2$，-OP（O）（OR^8）（OH），其中 R^8 是 C_1-C_4 烷基链，-OS（O）$_2$OH，-S（O）$_2$OH，-CO_2H，-OB（OH）$_2$，-OH，-CH_3，-NH_2 和-NR^9_3，其中 R^9 是 C_1-C_4 烷基链；

Z^2 选自-OP（O）（OH）$_2$，-P（O）（OH）$_2$，-OP（O）（OR^{10}）（OH），其中 R^{10} 是 C_1-C_4 烷基链，-OS（O）$_2$OH，-S（O）$_2$OH，-CO_2H，-OB（OH）$_2$，-OH，-CH_3，-NH_2 和-NR^{11}，其中 R^{11} 是 C_1-C_4 烷基链；

且其中就通式 IV 而言：

R^{12} is H 或 C_1-C_4 烷基链；

或通式 I，II，III 或 IV 的化合物的药学可接受盐。

3. 权利要求 1 或 2 的乳液，其中油滴总体的至少 90 体积%的粒度≤200 nm。

4. 权利要求 1～3 之一的乳液，其中油滴总体的至少 50 体积%的粒度≤110 nm。

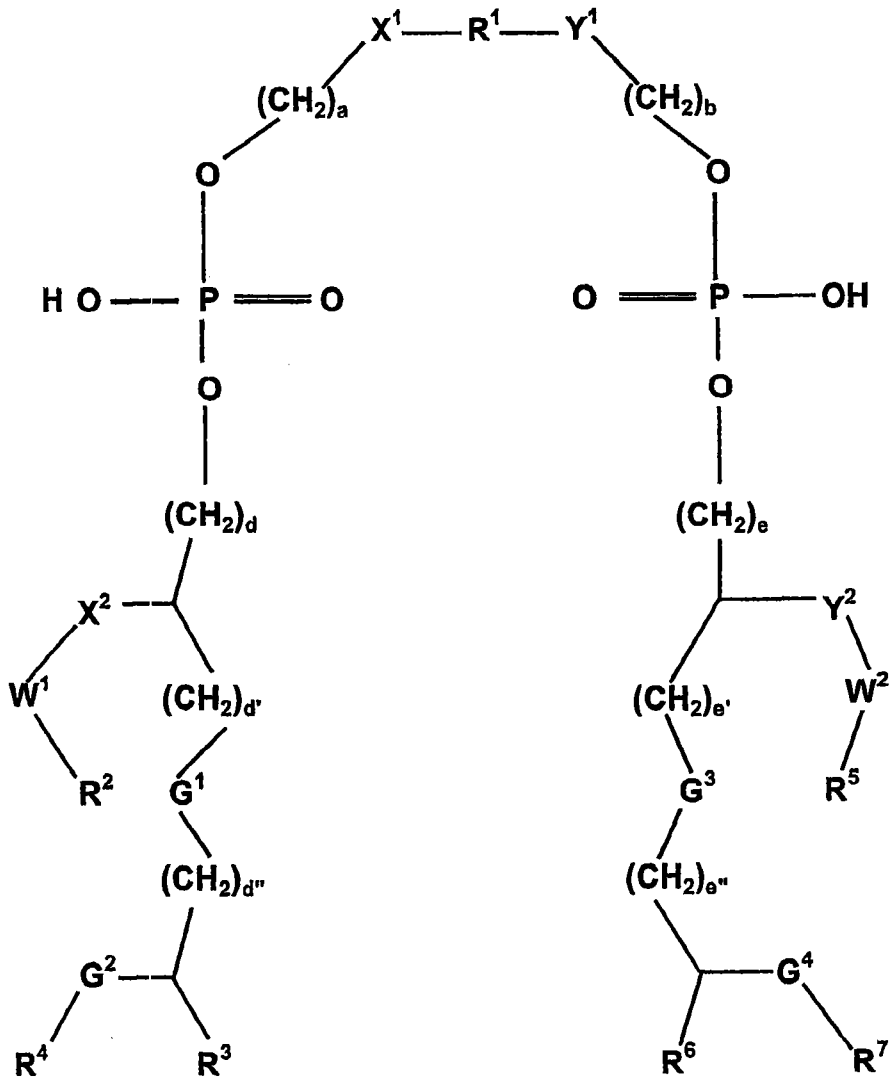
5. 权利要求 1～4 之一的乳液，其中相变发生在 45℃～80℃之间的温度，优选在 50℃～65℃之间。

6. 权利要求 1～5 之一的乳液，还包含至少一种糖醇。

7. 权利要求 6 的乳液，其中糖醇是山梨醇、甘露醇、甘油、木糖醇或赤藓醇。

8. 权利要求 1～7 之一的乳液，其中水相是缓冲盐溶液。

9. 权利要求 1～8 之一的乳液，其中 TLR4 兴奋剂是通式 I 的化学化合物：



或该化合物的药学可接受盐。

10. 权利要求 9 的乳液，其中：

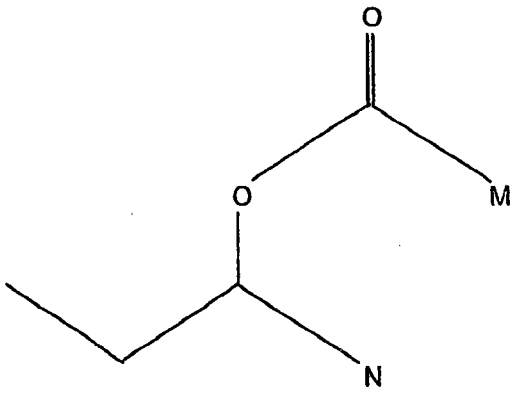
R1 是 C（O）或 C（O）-（CH2）$_n$-C（O），n 是 1，2，3 或 4，

a，b，d，d'，d''，e，e'和 e''独立地是 1 或 2，

X1，X2，Y1 和 Y2 是 NH，

W1 和 W2 是 C（O），

R2 和 R5 独立地选自 C_{10}-C_{15} 直链烷基，其任选地取代上氧代，NH-（C_{10}-C_{15} 直链烷基），和



其中 M 和 N 独立地是 C_2-C_{20} 直链烷基或烯基，

R3 和 R6 是 C_5-C_{10} 直链烷基，

R4 和 R7 选自氢，C（O）-（C_8-C_{12} 直链烷基）和 C（O）-（C_8-C_{12} 直链烯基），

G1 和 G3 是氧或-NH（CO）-，

G2 和 G4 是氧。

11. 权利要求 9 或 10 的乳液，其中化学化合物选自 ER803022，ER803058，ER803732，ER803789，ER804053，ER804057，ER804058，ER804059，ER804442，ER804764，ER111232，ER112022，ER112048，ER112065，ER112066，ER113651，ER118989，ER119327 和 ER119328。

12. 权利要求 1～11 之一的乳液，其中 TLR4 兴奋剂的数量与非离子亲水和疏水表面活性剂的总量之比介于 0.01×10^{-2}～5×10^{-2}，优选 0.05×10^{-2}～2×10^{-2}（wt/wt）。

13. 权利要求 1～12 之一的乳液，其中聚氧乙烯烷基醚选自聚氧乙烯（12）鲸蜡硬脂醇醚（ceteareth-12），聚氧乙烯（20）鲸蜡硬脂醇醚（ceteareth-20），聚氧乙烯（21）硬脂醇醚（steareth-21），聚氧乙烯（20）鲸蜡醇醚（ceteth-20），聚氧乙烯（10）鲸蜡醇醚（ceteth-10），聚氧乙烯（10）硬脂醇醚（steareth-10），聚氧乙烯（20）硬脂醇醚（steareth-20），聚氧乙烯（10）油醇醚（oleth-10）和聚氧乙烯（20）油醇醚（oleth-20）。

14. 权利要求 1～13 之一的乳液，其中疏水表面活性剂是脱水山梨醇酯或二缩甘露醇酯。

15. 权利要求 14 的乳液，其中疏水表面活性剂是二缩甘露醇一油酸酯。

16. 权利要求 14 的乳液，其中疏水表面活性剂是脱水山梨醇一油酸酯。

17. 权利要求 1～16 之一的乳液，其中亲水和疏水表面活性剂的数量应满足：表面活性剂的总 HLB 介于 8.5～10。

18. 权利要求 1～17 之一的乳液，其中角鲨烯代表乳液总重量的 5%～45 wt%。

19. 权利要求 1～18 之一的乳液，其中角鲨烯的数量与表面活性剂的数量之比介于 2.0～4.0，优选 2.5～3.5。

20. 权利要求 1～19 之一的乳液，其中 TLR4 兴奋剂是化学化合物 ER804057，非离子亲水表面活性剂是聚氧乙烯（12）鲸蜡硬脂醇醚（ceteareth-12），非离子疏水表面活性剂是脱水山梨醇一油酸酯，而含水溶剂是磷酸盐缓冲液或柠檬酸盐缓冲液。

21. 权利要求 20 的乳液，其中：

a. 角鲨烯的数量代表乳液总重量的的 5%～45 wt%（重量/重量），

b. 角鲨烯的数量与聚氧乙烯（12）鲸蜡硬脂醇醚（ceteareth-12）和脱水山梨醇一油酸酯总量之比介于 2.0～4.0，

c. ceteareth-12 和脱水山梨醇一油酸酯的数量应满足：HLB 介于 8.5～10，以及

d. ER804057 与聚氧乙烯（12）鲸蜡硬脂醇醚（ceteareth-12）和脱水山梨醇一油酸酯总量之比介于 0.01×10^{-2}～2×10^{-2}。

22. 权利要求 21 的乳液，还包含甘露醇，其数量代表乳液总重量的 0.1～10 wt%。

23. 权利要求 1～22 之一的乳液，还包含冷冻干燥底物。

24. 权利要求 23 的乳液，其中冷冻干燥底物是蔗糖、甘露醇和十二烷基麦芽苷的水溶液。

25. 权利要求 1～24 之一的乳液用于制备疫苗组合物的应用。

26. 权利要求 1～24 之一的乳液用于制备作为疫苗抗原包含至少一种流感病毒凝血素的疫苗组合物的应用。

27. 权利要求 1～24 之一的乳液用于制备作为疫苗抗原包含巨细胞病毒（CMV）包膜抗原的疫苗组合物的应用。

28. 权利要求 27 的乳液的应用，其中 CMV 包膜抗原是 CMV 的 gB 蛋白或其包含至少一种中和表位的衍生物。

29. 权利要求 28 的乳液的应用，其中 CMV 包膜抗原是已从中去除跨膜结构域且其中切割位点为无效的 gB 蛋白。

30. 制备权利要求 1～24 之一的 O/W 乳液的方法，包括通过提高温度获得 W/O 反相乳液的步骤，以及通过降低温度使 W/O 反相乳液转变为 O/W 乳液的步骤。

31. 权利要求 30 的方法，其中 W/O 乳液是通过实施将含有含水溶剂、聚氧乙烯烷基醚和 TLR4 兴奋剂的水相与含有角鲨烯和非离子疏水表面活性剂的油相混合从而获得 O/W 乳液的第一步骤，以及将 O/W 乳液加热至至少是乳液相变温度的温度的第二步骤获得的。

32. 权利要求 30 的方法，其中 W/O 乳液是通过分别加热含有含水溶剂、聚氧乙烯烷基醚和 TLR4 兴奋剂的水相以及含有角鲨烯和非离子疏水表面活性剂的油相至至少等于乳液相变温度的温度，随后混合该水相与油相，与此同时保持混合物的温度处于至少等于相变温度的温度而获得的。

33. 权利要求 31 或 32 的方法，其中 TLR4 兴奋剂在油相中，而不是在水相中。

34. 权利要求 31～33 之一的方法，其中水相还包含糖醇。

35. 权利要求 31～34 之一的方法，其中相转变温度介于 45℃～80℃，优选 50℃～65℃。

36. 一种制备疫苗组合物的方法，其中至少一种疫苗抗原与含有化学结构中不含糖环的 TLR4 兴奋剂进行混合，特征在于，含有该 TLR4 兴奋剂的 O/W 乳液按照相变方法制备，它包括通过提高温度得到 W/O 反相乳液形式的乳液的步骤，以及通过降低温度将 W/O 乳液转变为 O/W 乳液的步骤。

37. 权利要求 36 的方法，其中 O/W 乳液包含:

a）TLR4 兴奋剂，如权利要求 2 所定义，

b）角鲨烯，

c）含水溶剂，

d）非离子亲水表面活性剂，即聚氧乙烯烷基醚，以及

e）非离子疏水表面活性剂。

38. 权利要求 30～37 之一的方法，还包括冷冻干燥步骤。

热可逆水包油乳液

本发明涉及一种热可逆水包油（O/W）乳液形式的免疫刺激组合物，它包含 TLR4 兴奋剂，被称作 TLA4。

TLR4（（toll-like 受体型 4）是由免疫系统的抗原-呈递细胞表达的受体；它涉及对 gram（革兰氏）-细菌感染的早期防卫机制。细菌的脂多糖（LPS）是 TLR4 的天然配体；它激活受体，从而触发一连串生化事件，特别是 Nf-Kappa B 转录因子的激活，以及助炎症细胞因子的产生。单膦酰基脂类 A，后者来自 LPS 的水解，也是 TLR4 的配体，优点是其毒性比 LPS 小。

WO 2004/060396 描述 O/W（水包油）乳液形式的制剂，它包含磷脂佐剂。具有亚微米粒度的该乳液是借助高压均化器（微流化器）获得的。其生产方法使用高机械能以便获得足够大的剪切力来减少油滴的粒度。按照该公开内容，获得的乳液含有粒度近似于 500 nm 的液滴。

可心的是，能有一种该专利申请中建议的制剂的替代制剂，尤其是可利用较简单方法（不要求专门剪切技术），涉及低能量，同时又可重复、可靠和可用于大规模生产；另外，该佐剂制剂必须能通过增加对抗原的免疫应答改进疫苗的有效性，同时却不表现出将有损其完全安全给药的任何毒性迹象。

为此，本发明的目的是:

一种水包油（O/W）乳液，包含:

i）TLR4 兴奋剂，称作 TLA4，其化学结构不包含糖环，

ii）角鲨烯，

iii）含水溶剂，

iv）非离子亲水表面活性剂，其是聚氧乙烯烷基醚，

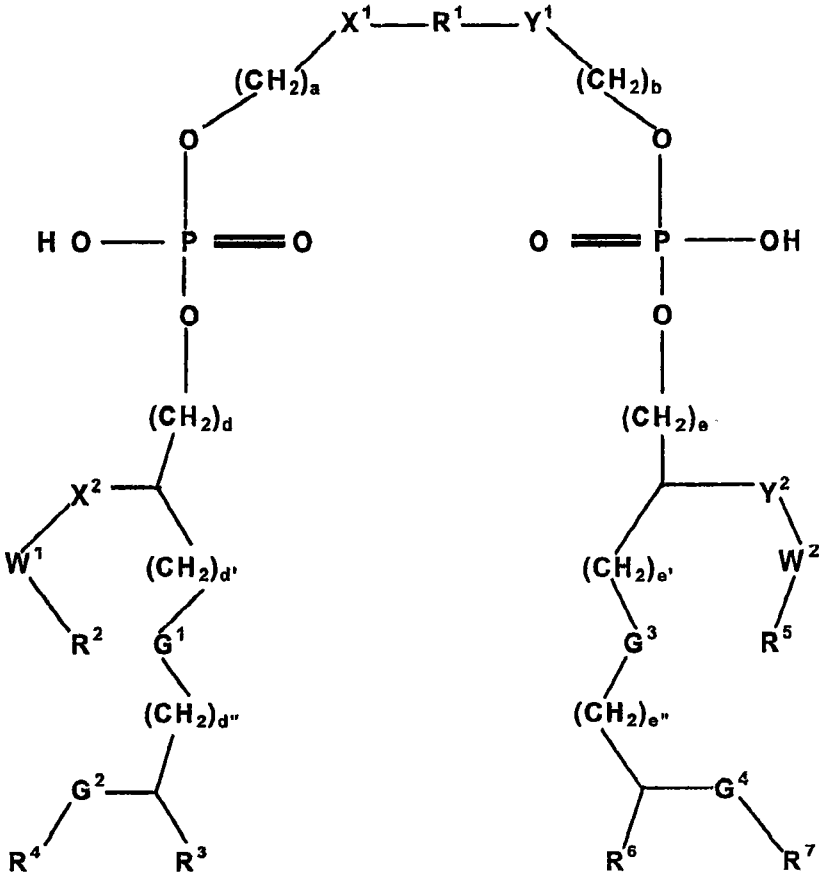
v）非离子疏水表面活性剂，并且

它是热可逆的。

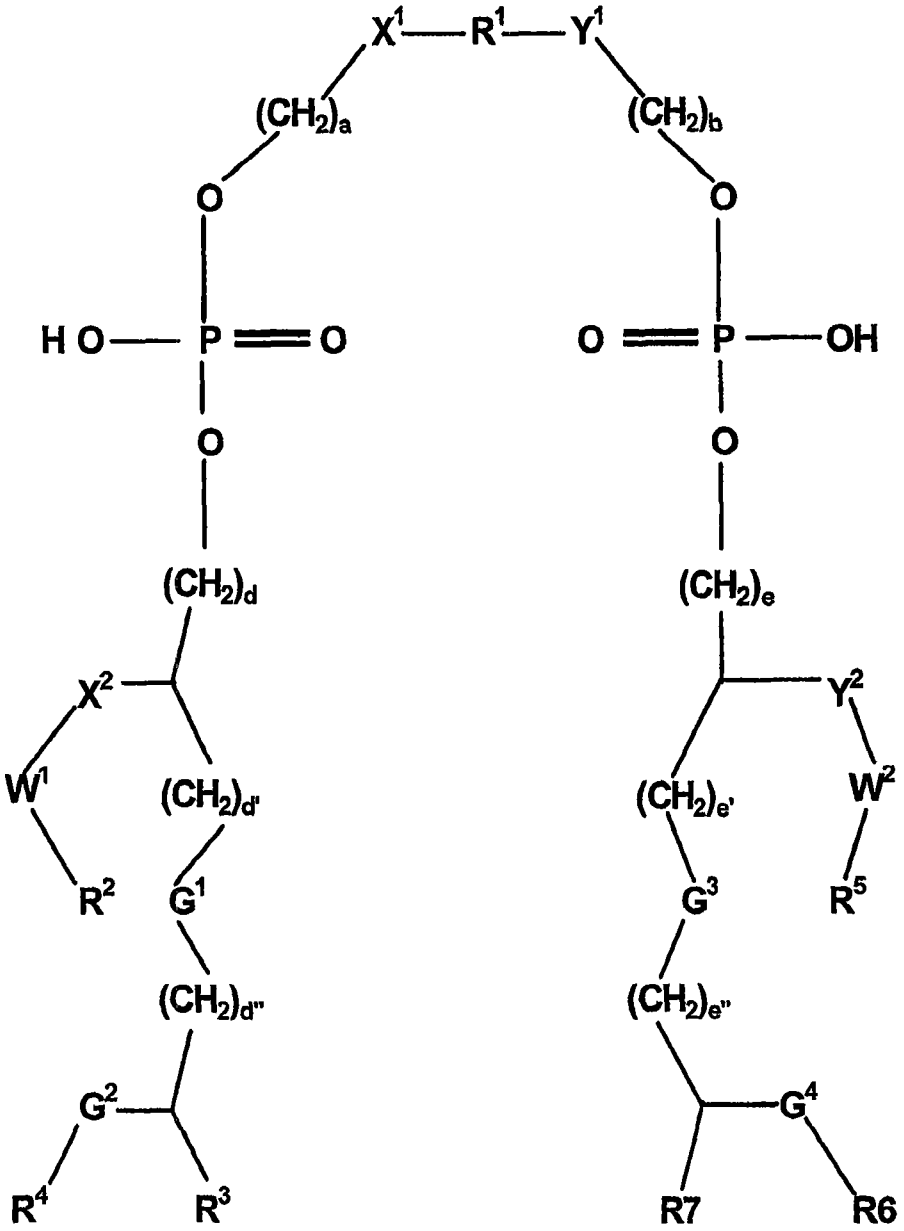
本发明乳液中包含的 TLR4 兴奋剂不是脂类 A 或脂类 A 的衍生物或其结构像脂类 A 的分子。

典型地，TLA4 是通式 I，II，III 或 IV 的化学化合物:

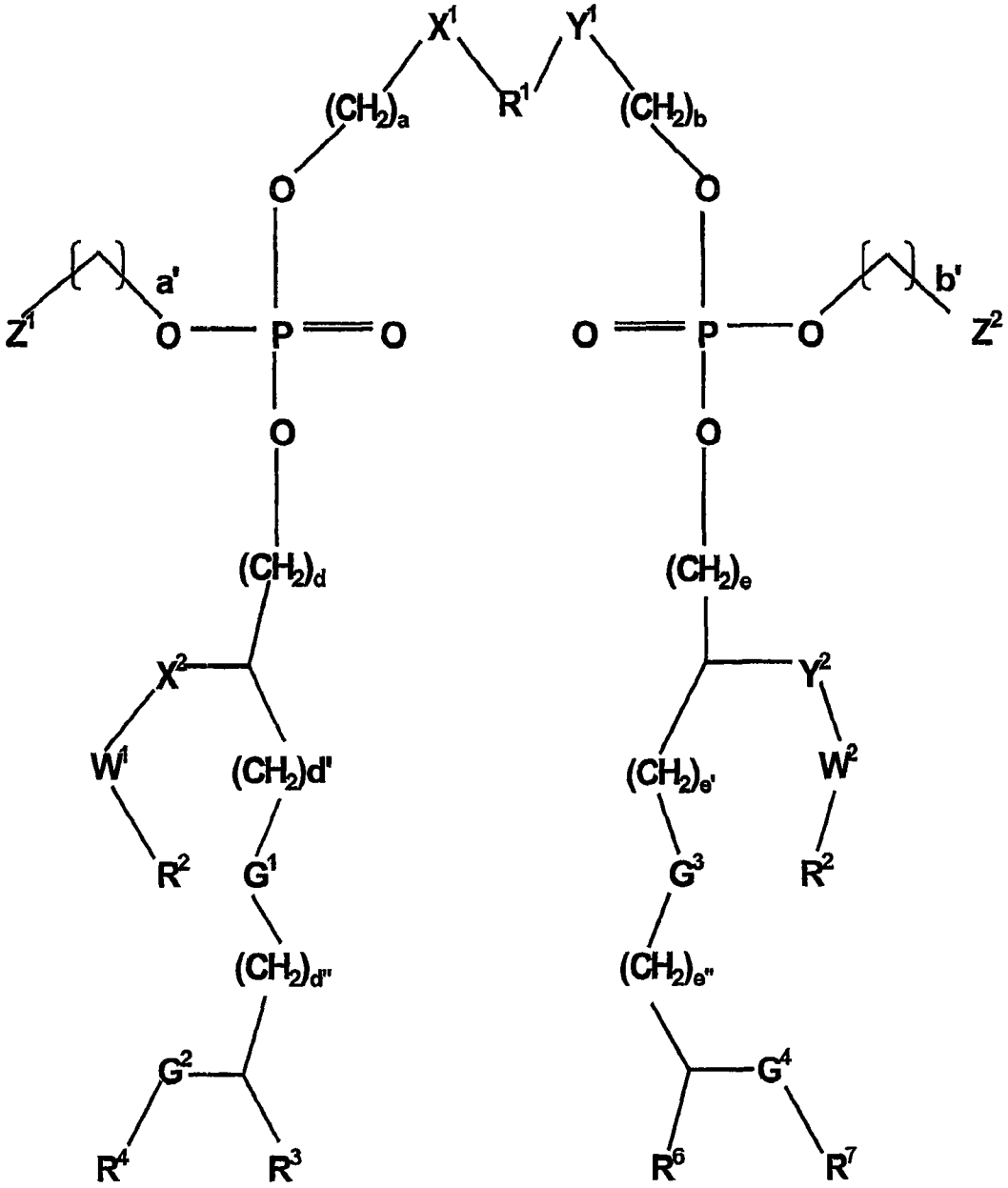
通式 I 的化合物



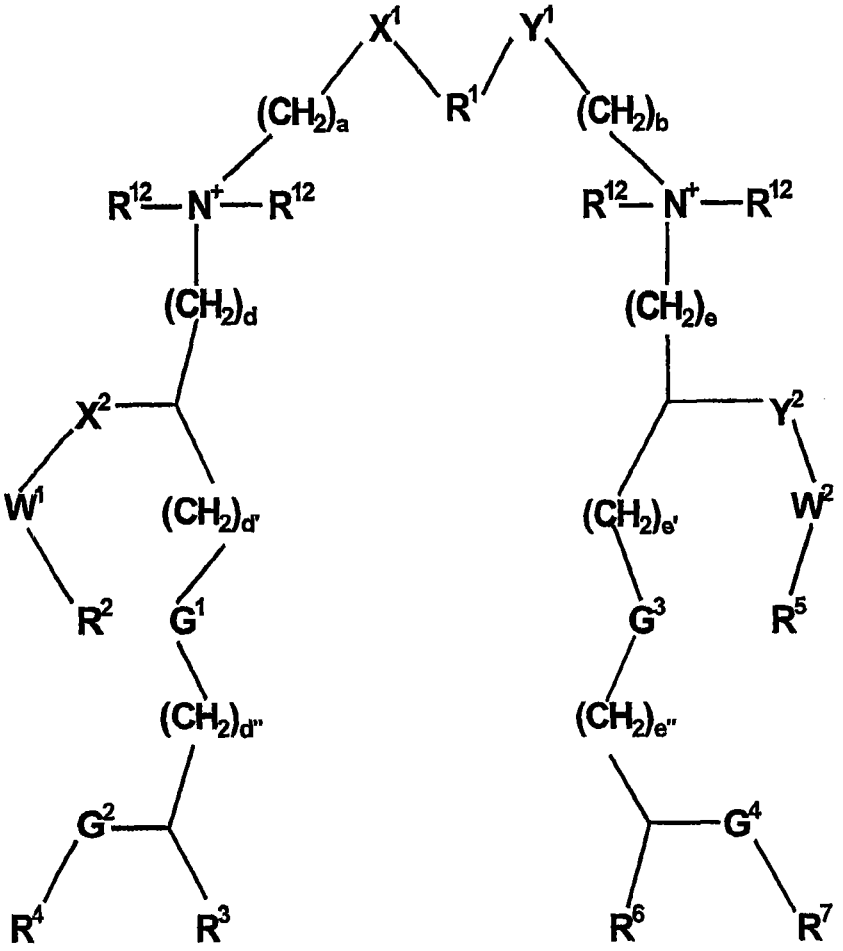
通式 II 的化合物



通式 III 的化合物



通式 IV 的化合物



其中，就通式 I，II，III 或 IV 每一个而言，R^1 选自：

a）C（O）；

b）C（O）-（C_1-C_{14} 烷基）-C（O），其中所述 C_1-C_{14} 烷基任选地取代上羟基，C_1-C_5 烷氧基，C_1-C_5 亚烷基二氧基，（C_1-C_5 烷基）氨基或（C_1-C_5 烷基）芳基，其中所述（C_1-C_5 烷基）芳基的芳基部分任选地取代上 C_1-C_5 烷氧基，（C_1-C_5 烷基）氨基，（C_1-C_5 烷氧基）氨基，（C_1-C_5 烷基）氨基（C_1-C_5 烷氧基），-O-（C_1-C_5 烷基）氨基（C_1-C_5 烷氧基），-O-（C_1-C_5 烷基）氨基-C（O）-（C_1-C_5 烷基）-C（O）OH，或-O-（C_1-C_5 烷基）氨基-C（O）-（C_1-C_5 烷基）-C（O）-（C_1-C_5）烷基；

c）含有 C_2-C_{15} 线型或支化链的烷基，任选地取代上羟基或烷氧基；以及

d）-C（O）-（C_6-C_{12} 亚芳基）-C（O）-，其中所述亚芳基任选地取代上羟基，卤素，硝基或氨基；

a 和 b 独立地是 0，1，2，3 或 4;

d，d'，d''，e，e'和 e''独立地是 0，1，2，3 或 4;

X^1，X^2，Y^1和 Y^2独立地选自空位，氧，NH 和 N（C（O）（C_1-C_4烷基）），和 N（C_1-C_4烷基）;

W^1和 W^2独立地选自羰基，亚甲基，砜和亚砜;

R^2和 R^5独立地选自:

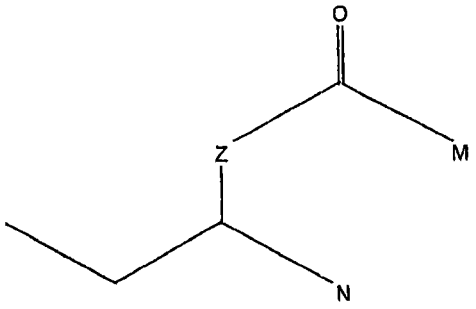
a）C_2 to C_{20}直链或支化链烷基，其任选地取代上氧代，羟基或烷氧基;

b）C_2 to C_{20}直链或支化链烯基或二烯基，其任选地取代上氧代，羟基或烷氧基;

c）C_2 to C_{20}直链或支化链烷氧基，其任选地取代上氧代，羟基或烷氧基;

d）NH-（C_2 to C_{20}直链或支化链烷基），其中所述烷基基团任选地取代上氧代，羟基或烷氧基；和

e）



其中 Z 选自 O 和 NH，而 M 和 N 独立地选自烷基，烯基，烷氧基，酰氧基，烷基氨基和酰基氨基，其包含 C_2-C_{20}线型或支化链;

R^3和 R^6独立地选自 C_2 to C_{20}直链或支化链烷基或烯基，其任选地取代上氧代或氟;

R^4和 R^7独立地选自 C（O）-（C_2 to C_{20}直链或支化链烷基或烯基），C_2 to C_{20}直链或支化链烷基，C_2 to C_{20}直链或支化链烷氧基，和 C_2 to C_{20}直链或支化链烯基；其中所述烷基，烯基或烷氧基基团可独立地并任选地取代上羟基，氟或 C_1-C_5烷氧基;

G_1，G_2，G_3和 G_4独立地选自氧，亚甲基，氨基，硫醇，-C（O）NH-，-NHC（O）-，和-N（C（O）（C_1-C_4烷基））-;

或 G^2R^4 或 G^4R^7 可合在一起是氢原子或羟基;

且其中就通式 III 而言:

a'和 b'独立地是 2，3，4，5，6，7 或 8，优选 2;

Z^1 选自-OP（O）（OH）$_2$，-P（O）（OH）$_2$，-OP（O）（OR^8）（OH），其中 R^8 是 C_1-C_4 烷基链，-OS（O）$_2$OH，-S（O）$_2$OH，-CO_2H，-OB（OH）$_2$，-OH，-CH_3，-NH_2 和-NR^9_3，其中 R^9 是 C_1-C_4 烷基链;

Z^2 选自-OP（O）（OH）$_2$，-P（O）（OH）$_2$，-OP（O）（OR^{10}）（OH），其中 R^{10} 是 C_1-C_4 烷基链，-OS（O）$_2$OH，-S（O）$_2$OH，-CO_2H，-OB（OH）$_2$，-OH，-CH_3，-NH_2 和-NR^{11}，其中 R^{11} 是 C_1-C_4 烷基链;

且其中就通式 IV 而言:

R^{12} is H 或 C_1-C_4 烷基链;

或通式 I，II，III 或 IV 的化合物的药学可接受盐。

本发明的乳液是热可逆的，就是说，当加热至至少等于“所述相变温度”的温度时，它从 O/W 乳液状态转变为 W/O 乳液状态。在微观尺度上，相变温度反映从指向油相的曲率到指向水相的曲率的改变，该转变必然涉及经过零平均曲率相的穿越（于是，该系统涉及层状相或者涉及微乳液）。

本发明乳液可通过变温相变方法获得，该方法从工业的观点看是非常有利的，因为它能方便地控制和适应大规模生产。这样的方法保证安全和成本效益，而这二者都是制药工业所必须的。另外，借助该方法，可获得油滴粒度小的单分散乳液，从而使乳液可借助截止粒度等于 200 nm 的灭菌过滤器轻易地滤过。

有利的是，本发明乳液油滴总体的至少 90%（体积）具有 ≤200 nm 的粒度。一般地，该乳液油滴总体的至少 50%（体积））具有 ≤110 nm 的粒度。按照一个特定特征，油滴总体的至少 90%（体积）具有 ≤180 nm 的粒度，并且油滴总体的至少 50%（体积））具有 ≤110 nm 的粒度。

一般地，本发明热可逆乳液是均质的。术语“均质乳液”是指这样一种乳液，其油滴粒度分布的图形表达（“granulogram”）为单峰的。就典型而言，该图形表达属“高斯型”。

油滴的粒度可利用各种不同手段测定，特别是采用激光衍射粒度分析仪，例如，LS 系列（特别是 LS230)Beckman Coulter 装置，或 Mastersizer 系列（特别是，Mastersizer 2000）的 Malvern 装置。这些装置的测定原

理基于分析当样品受到激光束照射时粒子散射的光强度随角度而变化（大、中和小角度检测器）。该分析是借助根据所用材料的粒度和性质选择的数学模型实施的。在亚微米粒度测定的情况下，需要应用专门光学模型（Mie 理论），考虑油相的折光指数（在本工况中，对角鲨烯来说是 1.495）以及水相的折光指数（例如，对水，是 1.332）；还必须能检测由非常细的粒子发射的弱光强度，这要求借助以下措施优化该分析方法：

- 用于大角偏振强度差示散射测定的附加检测元件（large-angle polarized intensity differential scattering measurement）（PIDS 系统，由 Coulter 生产，它能从 40 nm 测起），

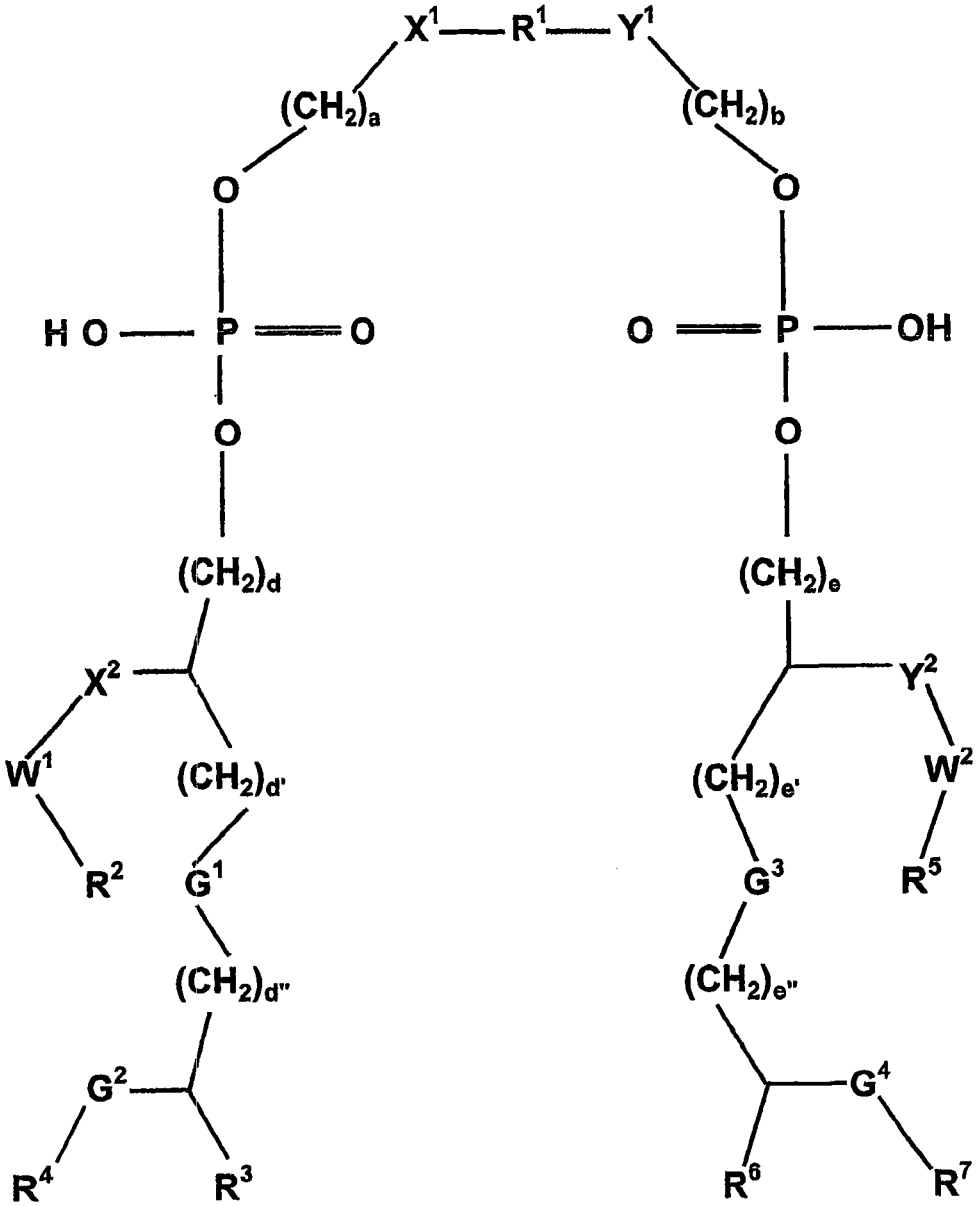
- 组合 2 种波长，蓝和红光的检测系统，由 Malvern 制造。较短-波长蓝光光源，与宽角散射和后散射检测器相连，能增强亚微米范围分析的性能等级。

视所使用的装置而定，测定值可随装置的元件以及使用数据处理软件而略有不同。

本发明热可逆乳液的相变温度是每种乳液特有的特征，随着其组分的本性及其相对浓度而变化。有利的是，本发明乳液的组成应选择得使相变出现在 45℃～80℃之间，优选 50～65℃之间的温度。该温度范围的优势在于没有乳液改变状态的危险，如果它在相对高温（≈37℃）之下贮存的话。另外，正如在制备热可逆乳液的方法中，诸组分的加热不超过 80℃，这有利于维持诸组分的结构完整性，特别是 TLA4 的。当乳液的相变温度高时，特别是当它大于或接近 80℃时，可有用的是，通过向乳液的组合物中加入糖醇来降低它，糖醇通常选自山梨醇、甘露醇、甘油、木糖醇或赤藓醇。当糖醇以 0.1～10 wt%的浓度范围，优选以 1～10 wt%的浓度范围，特别是 2～7 wt%的浓度范围使用时，乳液的相变温度可下降约 10℃。乳液的相变温度也可通过以缓冲盐水的水相替代仅由水组成的水相来降低。通常使用 TRIS 缓冲液、磷酸盐缓冲液如 PBS，不含 Ca^{2+}和 Mg^{2+}的 Dulbecco PBS 或柠檬酸盐缓冲液。

通式I，II，III或IV的化学化合物是通过按照特别是US 2003/0153532或US 2005/0164988中描述的方法合成的。

具体地说，本发明 TLA4 是一种通式 I 的化学化合物，



或该化合物的药学可接受盐。

优选的是，

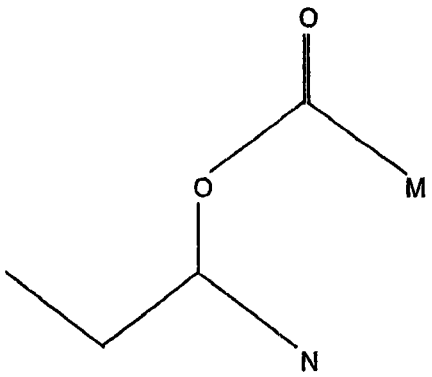
R1 是 C（O）或 C（O）-（CH2）$_n$-C（O），n 是 1，2，3 或 4，

a，b，d，d’，d’’，e，e’和 e’’独立地是 1 或 2，

X1，X2，Y1 和 Y2 是 NH，

W1 和 W2 是 C（O），

R2 和 R5 独立地选自 C_{10}-C_{15} 直链烷基，其任选地取代上氧代，NH-（C_{10}-C_{15} 直链烷基），和



其中 M 和 N 独立地是 C_2 to C_{20} 直链烷基或烯基，

R3 和 R6 是 C_5-C_{10} 直链烷基，

R4 和 R7 选自氢，C（O）-（C_8-C_{12} 直链烷基）或 C（O）-（C_8-C_{12} 直链烯基），

G1 和 G3 是氧或-NH（CO）-，

G2 和 G4 是氧。

TLA4 表现出体外和/或体内的免疫刺激活性。体外免疫刺激活性采用特别是以下方法评估：

1）测定全人血细胞生产 TNFα的增加，或

2）测定在 TNFα启动子控制下以碱性磷酸酶基因由线转染（line transfected）的 THP-1 生产碱性磷酸酶的增加，或

3）测定鼠科脾细胞生产细胞因子如 IL-10 和干扰素γ的增加，或

4）测定鼠科巨噬细胞线 RAW264 生产 TNFα的增加，或

5）测定 U373 人体星形细胞瘤生产 IL-6 的增加，或

6）由流动细胞计量术测定由人单核细胞衍生的树突细胞活化/成熟的增加，根据活化标记物如 CD25，CD80/CD83 的表达。

所有这些测定方法都是本领域技术人员熟知的，特别是，描述在 US 2003/0153532 的实施例 7 中，或在 Journal of Biological Chemistry，（2001），vol 276/3，page 1873-1880 中。

体内免疫刺激活性反映在体液响应和/或在特异细胞应答上。为评估体液响应，测定抵御抗原的特异抗体的生产。例如，有关此种响应的评估，可参见 US 2003/0153532 的实施例 8 中描述的化验方法。当注射 TLA4-相关抗原后观察到特异抗体（在总免疫球蛋白的或特异同种型的形式内）的产生大于仅给予同样数量抗原本身后观察到的时，就认为 TLA4 发挥了体内免疫刺激活性。TLA4 的免疫刺激活性也可利用测定特

异细胞应答的化验方法评估，该方法乃是本领域技术人员熟知的，例如，通过测定细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）或淋巴增生来评估。

优选的是，TLA4 选自 US 2003/0153532 中以下列名称提到并描述的化学化合物：ER803022，ER803058，ER803732，ER803789，ER804053，ER804057，ER804058，ER804059，ER804442，ER804764，ER111232，ER112022，ER112048，ER112065，ER112066，ER113651，ER118989，ER119327 和 ER119328。

该化合物可呈非对映异构体形式或呈外消旋（非对映异构体的混合物）形式，这是指当化合物结构包含几个不对称碳时。例如，ER804057 和 ER804053 具有 4 个不对称碳，是 ER112066 的非对映异构体，后者是外消旋形式。ER804057 呈（R,R,R,R）-型异构体构型，而 ER804053 则处于（R,S,S,R）-型构型。类似地，ER804058，其处于（R,R,R,R）-型异构体构型，和 ER804059，其处于（R,S,S,R）-型异构体构型，二者是 ER113651 的非对映异构体，呈外消旋形式。ER803022，其处于（R,R,R,R）-型构型，ER803732，其处于（R,S,S,R）构型，和 ER803789，其处于（R,R,S,R）构型，它们也是同一化学分子的非对映异构体。优选使用具有 R,R,R,R-型构型、通常比其他形式更具活性的非对映异构体。在这些当中，ER804057 是特别优选的。它是十二烷酸（1R,6R,22R,27R）-1,27-二庚基-9,19-二羟基-9,19-二氧代-14-氧代-6,22-双[（1,3-二氧代十四烷基）氨基]-4,8,10,18,20,24-六氧杂-13,15-二氮杂-9,19-二膦杂二十七烷-1,27-二基酯；它呈游离酸或呈盐的形式。游离酸的分子量是 1579，钠盐的是 1624。钠盐的经验式是 $C_{83}H_{158}N_4Na_2O_{19}P_2$。

从结构的角度，本发明 TLR4 兴奋剂是两亲分子。两亲分子具有既是亲水又是疏水的性质，并具有随时间沉淀的倾向。它们常常不完全地溶解于有机或含水溶剂并且常常是溶液不稳定或难以复制的原因。目前，需要改进这些分子的配方。如在本发明中描述乳液通过提供随时间稳定的乳液满足了这种需要。本发明中的乳液在+4℃经过 6 个月贮存仍保持其最初具有的特性：油滴粒度分布基本上不变；本发明的乳状、流体和均质方面得以保持；并且，显然，TLA4 的结构完整性不受损害，正如在实施例 II 中所示。甚至还注意到，本发明乳液能在-2℃的温度贮存至少 48 h，而就液滴粒度分布而论看不到任何明显改变。另外，本发明乳液降低某些 TLR4 兴奋剂的致热能力。

TLA4 的数量与乳液的亲水和疏水表面活性剂总量之比一般介于 0.01×10^{-2} 和 5×10^{-2} 之间，优选介于 $0.1 \times 10^{-2} \sim 2 \times 10^{-2}$。在这一比值范围，TLA4 的数量足够小，以致不对表面活性剂的乳化能力产生任何影响，但它以足以发挥体外和/或体内免疫刺激活性的数量存在。

本发明亲水表面活性剂具有≥10 的 HLB（亲水/亲油平衡值）并属于聚氧乙烯烷基醚（PAE）化学类别，亦称作聚氧乙烯脂肪醇醚。这些非离子表面活性剂是通过脂肪醇与环氧乙烷之间的化学缩合获得的。它们具有类型 $R-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ 的化学通式，其中残基 R 一般代表饱和或不饱和烷基残基并且 n 代表环氧乙烷单元的数目。按照本发明，R 含有 1～50 个碳原子，优选 4～20 个碳原子，特别优选 10～20 个碳原子。n≥2，一般介于 4～50。本发明乳液一般含有单一亲水 PAE。几种 PAE 的混合物也适合，只要总 HLB≥10。

适合本发明主题的聚氧乙烯脂肪醇醚可呈常温下为液体或固体的形式。在固体化合物当中，优选那些能直接溶解在水相中或者不要求很大加热的化合物。

只要环氧乙烷单元数目足够，月桂醇、肉豆蔻醇、鲸蜡醇、油醇和/或硬脂醇的聚氧乙烯醚特别适合本发明主题。它们特别可见诸于以商品名 Brij®，Eumulgin® 或 Simulsol® 而著称的产品系列中。

作为非离子亲水表面活性剂，本发明特别优选的乳液含有聚氧乙烯烷基醚，其选自聚氧乙烯（12）鲸蜡硬脂醇醚（ceteareth-12）（商品名 Eumulgin® B1），聚氧乙烯（20）鲸蜡硬脂醇醚（ceteareth-20）（商品名 Eumulgin® B2），聚氧乙烯（21）硬脂醇醚（steareth-21）（Eumulgin® S21），聚氧乙烯（20）鲸蜡醇醚（ceteth-20）（Simulsol® 58 或 Brij® 58），聚氧乙烯（10）鲸蜡醇醚（ceteth-10）（Brij® 56），聚氧乙烯（10）硬脂醇醚（steareth-10）（Brij® 76），聚氧乙烯（20）硬脂醇醚（steareth-20）（Brij® 78），聚氧乙烯（10）油醇醚（oleth-10）（Brij® 96 或 Brij® 97）和聚氧乙烯（20）油醇醚（oleth-20）（Brij® 98 或 Brij® 99）。跟在每一种化学名称后面的数字对应于化学式中的环氧乙烷单元数目。

特别合适和由于其半合成源而优选的化合物是 Cognis 公司提供的 Eumulgin™ B1（ceteareth-12）。

本发明乳液还包含非离子疏水表面活性剂，其 HLB≤6。乳液通常含有单一非离子疏水表面活性剂。几种非离子疏水表面活性剂的混合物

也适合，只要总 HLB≤6。就典型而言，它涉及疏水脱水山梨醇酯或疏水二缩甘露醇酯。脱水山梨醇酯通常是通过脂肪酸与山梨醇、山梨醇一酐或山梨醇二酐之间的酯化反应获得的。二缩甘露醇酯通常是通过脂肪酸与甘露醇一酐或二酐之间的酯化反应获得的。优选的是，它涉及二缩甘露醇一油酸酯(由公司 Sigma 销售或由公司 Seppic 以商品名 Montanide 80™ 供应）或脱水山梨醇一油酸酯（以商品名 Span® 80，Dehymuls SMO™（Cognis）或 Montane 80™（Seppic）供应）。

通过从现有技术建议的所有表面活性剂当中选择这些特殊表面活性剂来制备乳液，现已发现，一种佐剂 O/W 乳液可非常有利地采用一种非常容易实施的相变方法制备。

当亲水和疏水表面活性剂的相应浓度满足混合物的 HLB（HLB_m）介于 8.5～10，特别是 8.6～9.6 时，乳液通常将是均质的，并且常常油滴总体的至少 90%（体积）的粒度≤0.2 μm。而且，这样的乳液特别稳定。优选地调节角鲨烯乳液中亲水和疏水表面活性剂的数量，以便使 HLB_m 为 8.5～10，特别是使 HLB_m 介于 8.6～9.6。为确定亲水和疏水表面活性剂各自在乳液组合物中的浓度，采用以下公式：

$$HLB_m=HLB_e \times M+HLB_{pae} \times (1-M)$$，其中，

HLB_m 对应于混合物的 HLB，优选介于 8.5～10，特别是 8.6～9.6。

HLB_e 对应于疏水表面活性剂的 HLB。

M 对应于由疏水表面活性剂和 PAE 组成的混合物中疏水表面活性剂的重量百分数。

HLB_{pae} 对应于 PAE 的 HLB。

角鲨烯，代表乳液的油相，具有经验化学式 $C_{30}H_{50}$ 并包含 6 个双键。该油为可代谢的并且具有用于可注射药物产品所要求的品质。它来自鲨鱼肝（动物源）但也可从橄榄油（植物源）提取。好的结果已由，特别是采用公司 Fluka 提供的角鲨烯获得，后者是动物源的。一般而言，角鲨烯的数量代表乳液总重量的 5～45%。

本发明乳液中的角鲨烯数量与表面活性剂总量的质量比一般介于 2.0～4.0，优选 2.5～3.5。

特别优选的本发明乳液的组成包含：

- 角鲨烯，
- 磷酸盐缓冲液或柠檬酸盐缓冲液，作为含水溶剂，
- 化合物 ER 804057，作为 TLR4 兴奋剂，
- ceteareth-12（Eumulgin® B1），作为亲水表面活性剂，
- 脱水山梨醇一油酸酯，作为疏水表面活性剂。

角鲨烯的数量代表乳液总重量的 5～45 wt%。化合物 ER804057 的数量通常代表 2 种表面活性剂重量的 0.05%～2 wt%。优选的是，ceteareth-12 的和脱水山梨醇一油酸酯的数量应满足，2 种表面活性剂的混合物的 HLB 介于 8.5～10，更优选 8.6～9.6。角鲨烯的数量与 ceteareth-12 的和脱水山梨醇的一油酸酯的总量之比介于 2.0～4.0，优选 2.5～3.5。另外，该组合物可包含甘露醇，其数量一般代表乳液总重量的 0.1%～10 wt%。

本发明乳液的水相还可包含含有 1 或多种防冻剂的冷冻干燥底物。防冻剂通常选自糖如蔗糖，多元醇（如甘露醇或山梨醇），或糖的衍生物(如烷基聚苷,例如,硅基-D-半乳糖苷糖醛酸钠或十二烷基β-麦芽苷)。通常使用作为混合物的包含蔗糖、甘露醇和十二烷基β-麦芽苷的冷冻干燥底物。于是，本发明乳液可进行冷冻干燥并以冷冻干燥物的形式保存。然而，它将保存其全部特性，因为，一旦将它分散到水相中，它将重新变成乳状、稳定和流态、热可逆 O/W 乳液，其中油滴粒度分布近似于冷冻干燥前预先存在的。

本发明乳液还起到对抗原的免疫应答佐剂的作用。就本发明目的而言，术语“抗原”是指可用于疫苗的任何抗原，不论它是活的、减毒的抑或灭活的整个微生物、微生物的提取物或者亚基形式。当它是亚基形式时，抗原的本质无关紧要：它可以是肽、蛋白、糖蛋白、多糖、糖脂、脂酰肽或核酸。在适合本发明主题的抗原当中，可举出源于下列的细菌抗原：破伤风梭菌、Clostridium diphtheriae（白喉梭菌）、百日咳梭菌、血内生流感 b-型、肺炎链球菌、Neisseria meningitidis、Shigella sp.（志贺菌种）、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌或表皮葡萄球菌、结核杆菌、Chlamydia trachomatis（沙眼衣原体）或者链球菌种；源于下列病毒的病毒抗原：肝炎种 A、B 或 C 病毒，流感病毒、呼吸合胞体病毒、西尼罗河病毒、狂犬病毒、脊髓灰质炎病毒、HIV（艾滋病）病毒、登革病毒、日本脑炎病毒、黄热病病毒、巨红胞病毒或疱疹病毒；源于特别

是下列来源的抗原：疟原虫种或肿瘤抗原。这些抗原可采用本领域技术人员熟知的基因重组方法或采用提取方法获得。本发明乳液通过增加特异抗体的生产作用于体液免疫，和/或通过促进特别是T淋巴细胞增生、特异细胞溶解响应（CTL响应）和/或由活化的胸腺依赖性细胞生产的细胞因子、化学因子和生长因子的生产作用于特异细胞免疫。

正因为如此，本发明的主题又是本发明乳液用于制备疫苗组合物的应用。获得的该疫苗组合物已证明例如致免疫能力更强，因为该组合物能诱导更大的特异免疫应答，不论它是体液型和/或细胞型的，或者由于为获得同样强度和可比持续时间，需要较少数量的抗原。由本发明乳液获得的疫苗组合物可通过任何一种通常使用或推荐用于疫苗的途径给药：非经肠道、皮内、皮下、肌肉内或黏膜；并且可采取各种不同形式给药，特别是液体或冷冻干燥的。它可利用针筒或者无针注射器进行肌肉内、皮下或皮内注射，或者利用鼻子吸入喷雾给药。

该疫苗组合物一般呈抗原与本发明乳液的混合物形式。它也可呈临时制剂的形式。在此种工况中，抗原与乳液只是到了临给予疫苗组合物之前或者在给予的时刻才彼此接触。例如，抗原可进行冷冻干燥并在给药之前以乳液分散，或者反过来，乳液可呈冷冻干燥形式，然后再以抗原溶液分散。疫苗组合物也可置于专门注射装置中，例如，“旁路”针筒，这是指当要求抗原不与乳液混合时。

当疫苗组合物采取通过以抗原溶液稀释本发明乳液获得的混合物形式时，它通常呈 O/W 乳液形式，其中角鲨烯的数量一般代表组合物总重量的 0.5～5 wt%。它也可呈热可逆 O/W 乳液的形式，这是当角鲨烯在疫苗组合物中的数量达到或超过 5 wt%时。当疫苗组合物是一种热可逆 O/W 乳液时，它特别呈油滴总体的至少 90%（体积）并可具有≤ 0.2 μm 粒度的形式。

令人惊奇的是，本发明乳液诱导中和抗体的能力大于通过微流化获得的现有技术 O/W 乳液，后一种组合物含有角鲨烯、聚氧乙烯脱水山梨醇一油酸酯（（Tween® 80）和脱水山梨醇三油酸酯（Span® 85）（现有技术 O/W 乳液）。

中和抗体是抗传染性微生物的功能抗体，由已经对与该微生物有关或由它衍生的抗原免疫的或曾接触过该微生物的个体产生，并且能预防细胞被此种微生物感染。它们在预防和治疗由细胞内微生物，特别是病

毒或单细胞寄生物，特别是疟原虫种引起的感染中起非常重要的作用。疟原虫 falciparum 的“生殖胞芽”形式的的抗原（例如，子孢子的主要表面蛋白（circumsporozoite protein），LSA3，或 the Pfs 16 抗原），以及源于疟原虫 falciparum 的“裂殖子”形式的抗原（例如，MSP1，MSP2，MSP3，EBA-175，Rhop-1，Rhop-2，Rhop-3，RAP-1，RAP-2，RAP-3，Pf155/RESA 或 AMA-1 抗原），能诱导产生中和抗体。本发明乳液用于制备含有 1 或多种由疟原虫 falciparum 生殖胞芽或裂殖子衍生的抗原的疫苗组合物的应用已表明，能放大中和免疫应答。本发明乳液特别可用于制备包含，作为疫苗抗原、疟原虫 falciparumLSA3 蛋白的疫苗组合物。记录此种蛋白编码的基因已被 Gardner 等人，（Science（1998），282，1126-1132）找到并且存在于 Plasmodium falciparum 的染色体 2（株 3D7）上。该基因的完整序列是 12240 个碱基对长并记录了 1558 种氨基酸蛋白。该核苷酸和蛋白序列描述在 EMBL 数据库中，检索号 AE001424，以及 uniprot 号 096275-PLAF7。所描述的整个蛋白，肽，或该蛋白的片段，例如在 WO 02/38176 中描述的那些，可用作疫苗抗原。通常采用这样的整个蛋白（它包含 1 或多个点突变以便考虑到存在于疟原虫 falciparum 各种株之间的变化）或该蛋白的片段：其氨基酸序列具有与 uniprot 号 096275-PLAF7 中描述的整个序列至少 80%的同一性。某些抗病毒疫苗的有效性，在某些情况下，根据它们诱导的中和抗体的滴定度来评估。流感疫苗就是此种情况，其有效性涉及血凝-抑制（HAI）抗体的滴定度。

本发明乳液被用于制备治疗或预防与流感病毒相关的人或动物（鸟类、马）的传染病。依流感疫苗的性质而定，疫苗组合物可呈各种不同形式：

- 当流感疫苗含有 1 或多种灭活整个或“断裂的”病毒株，或呈含有来自 1 或多种病毒株的提纯的凝血素的亚基疫苗形式，或呈病毒体（Berna 疫苗）时，疫苗组合物一般呈 O/W 乳液的或热可逆 O/W 乳液的混合物形式。

- 当流感疫苗含有 1 或多种活减毒病毒株时，疫苗组合物优选被预先置于旁路针筒型的装置中，以便使活病毒不直接接触该乳液。病毒悬浮体与本发明乳液被置于针筒的 2 个不同间隔内。

该流感疫苗可按照本领域技术人员熟知的方法由在卵或在细胞内

培养的流感病毒来制造，并全都包含作为主要成分的 1 或多种病毒株的凝血素。

因此，本发明的主题还在于本发明乳液用于制备包含作为疫苗抗原的 1 或多种流感病毒凝血素的疫苗组合物的应用。该疫苗组合物可用于对以下情况的免疫：

1）对流感病毒呈血清反应阴性的个体的群体：这些是从未接触或被流感病毒或其免疫原成分敏化过的个体，或者从未接触过导致大流行的新株流感病毒的个体；

2）对流感病毒呈血清反应阴性的个体的群体：这些是已接触过或被流感病毒或其免疫原成分敏化的个体；

3）通常表现出对细胞和/或体液免疫的缺损，正如特别是对流感病毒表现的老年个体的群体。

本发明乳液也可用于制备治疗或预防由疱疹病毒（HSV1，HSV2，巨核细胞病毒（CMV））引起的传染病。通常在该疫苗组合物中使用病毒包膜抗原。在 CMV 感染中，抗病毒包膜蛋白，主要是糖蛋白 B（gB）和糖蛋白 H（gH）的并能中和病毒感染的抗体，在保护性免疫的发展中起到非常重要的作用。本发明乳液在含 CMV 包膜蛋白疫苗组合物制备中的应用具有增加中和抗体的生产的效应。

因此，本发明的一个主题是本发明乳液用于制备含有作为疫苗抗原的 CMV 包膜抗原的疫苗组合物的应用。就典型而言，该抗原是 gB 糖蛋白和/或 gH 糖蛋白。它也可以是一种由 gB 和/或 gH 衍生的肽或多肽，其包含 1 或多种中和抗原表位。

处于其天然形式的 gB（gp130），由 CMV 的 UL 55 基因来编码，是一种 906 或 907 种氨基酸的糖蛋白，具体取决于所涉及的是 AD169 株或 Towne 株。这两株的蛋白序列描述在 US 2002/0102562（图 2）中。gB 的天然形式含有信号序列，接着是含有介于残余精氨酸 460 与丝氨酸 461 之间的内切蛋白水解部位的细胞外的域，接着是跨膜结构域，然后接细胞内的域。曾描述过几种包括中和抗体的抗原域。这涉及特别是位于 gp 130 的氨基酸残基 461 与 680 之间的域，该域被细分为 2 个不连续域，即在残基 461 与 619 之间的域，和残基 620 与 680 之间的域（US 5,547,834）。它还包括位于氨基酸残基 552 和 635 之间的 AD-1 域，或位于 50～77 氨基酸残基之间的 AD-2 域（Journal of General Virology

（1999），80，2183-2191；Journal of Virology（2005），79，4066-4079）。因此，在其氨基酸序列中包含与上面提到的域之一同源的序列的多肽适合本发明的目的。就典型而言，该多肽在其氨基酸序列中含有与位于 gp 130 的残基 461 与 680 之间的那个同源的序列，或者更具体地说，与位于残基 552 与 635 之间的那个同源的序列。术语“同源序列”是指任何这样的氨基酸序列，只要它具有至少 80%与位于 Towne 或 AD 169 株（描述在 US 2002/0102562）的 gp130 上、所考虑的抗原域的氨基酸序列的同一性。就典型而言，此种序列同源基于至少 90%的同一性，更具体地说，该序列同源基于 100%的序列同一性。

在适合本发明目的的 gB-衍生的肽或多肽当中，可举出，特别是，gp 55，正如在 US 5,547,834 中描述的。它由 gB 在内切蛋白水解部位处的裂解衍生而来；其氨基酸序列对应于介于丝氨酸残基 461 与 C-链端之间的序列。gp 55 的剪取形式也可使用，例如，从跨膜序列的全部或部分以及细胞内 C-末端域的全部或部分剪取的 gp 55（例如，具有与残基 461 与 646 之间的 gp 130 氨基酸序列同源序列的肽），或者从细胞内 C-末端域全部或部分剪取的 gp 55（例如，具有与残基 461 与 680 之间的 gp 130 氨基酸序列同源的序列的肽），后者描述在 US 5,547,834 中。也可以使用带有在内切蛋白水解切割位点的 1 或多个突变从而使后者变得无效的 gB 的突变形式。突变位于 gp 130 序列的残基 457 与 460 之间，更具体地说，位于精氨酸 460 和/或赖氨酸 459 和/或精氨酸 457 处。特别适合本发明目的的 CMV 包膜抗原是一种 gB 的剪裁形式，它是从 C-末端域的全部或部分剪取和/或从跨膜序列的全部或部分剪取的，并且其中切割位点无效。特别优选的 gB 剪裁形式对应于 US 6,100,064 中描述的那种，被称作 gBdTM；它带有在切割位点的 3 个突变，以及在氨基酸残基缬氨酸 677 与精氨酸 752 之间的消除，从而使细胞外域直接连接在细胞质域上。

gB 蛋白或由它衍生的肽或多肽是利用基因重组方法制取并按照本领域技术人员熟知的方法提纯的。特别可使用 US 6,100,064 和 US 2002/0102562（在此收作参考）中描述的方法。为提高其免疫原性，可将它们二次接合到载体蛋白上或融合到其他蛋白上，特别是到颗粒-形成蛋白如肝炎 B 包膜抗原（HbS）上。gB 蛋白或由它衍生的肽或多肽也可由重组病毒表达，特别是由重组腺病毒或重组 poxviruses（腺病毒）表

达。为制备此类重组载体 gB 或衍生的肽，可采用特别是 US 6,162,620，US 5,866,383，US 5,552,143，US 6,183,750，US 5,338,683 或 WO 9215672 或 WO 9639491 中描述的方法。gB 也可由通过连续送过细胞培养物而减毒的 CMV 的株，特别是已经就疫苗目的试验过的 Towne 株提供。

gH 蛋白由 CMV 的 UL 75 基因编码。它是一种 742 或 743 种氨基酸的糖蛋白，这取决于该株是 Towne 株或 AD169 株。其序列描述在 US 5,474,914（图 1）和 US 6,610,295（图 5（a））。由其核苷酸序列推断的 gH 的蛋白序列包含信号肽，接着是不具有内切蛋白水解切割位点的细胞外域，接着是跨膜结构域，再接 C-末端细胞质域。该中和肽存在于细胞外域中，主要在该域的 N-末端部分，更具体地说在天然 gH 蛋白序列的氨基酸残基 15 与 142 之间，进一步具体地说，介于氨基酸残基 33 与 142 之间。AD 169 株的主要中和表位已被找到，介于 gH 的序列的残基 33 与 43 之间，并具有序列 LDPHAFHLLL（Urb M 等人：J. Virol（1992，vol 66/3，p1303-1311））。因此，在其氨基酸序列中包含与 LDPHAFHLLL 同源的序列，或与介于适合本发明目的 gH 蛋白序列残基 15 与 142 之间或残基 33 与 142 之间的序列同源的序列。术语“同源序列”是指任何氨基酸序列，只要它具有至少 80%与位于 AD 169 株的 gH 蛋白序列的残基 15 与 142 或残基 33 与 142 之间的氨基酸序列的同一性，或者与序列 LDPHAFHLLL 的同一性。更具体地说，序列同源基于至少 90%的同一性，更具体地说，序列同源基于 100%的序列同一性。

作为适合本发明目的的 gH-衍生肽或多肽，可举出从其跨膜区域的全部或部分剪取和/或从其细胞质区域的全部或部分剪取的 gH。就典型而言，这对应于这样的 gH 蛋白，从中，有至少 5 个 C-末端残基，优选至少 10 个 C-末端残基，更优选 20～34 个氨基酸序列的 C-末端残基已被消除。

gH 蛋白和由它衍生的多肽或肽是采用本领域技术人员熟知的基因重组方法制取和提纯的，特别是，US 5,474,914 或 US 5,314,800（在此收作参考）中描述的那些。为提高其免疫原性，可将它们二次接合到载体蛋白上，它们也制成融合蛋白的形式，正如在 J. Virol（1992，vol 66/3，1303-1311 页）中描述的。该 gH 蛋白和由它衍生的多肽或肽也可由重组病毒表达，特别是由重组腺病毒或重组 poxviruses（腺病毒）表达。为制备表达 gH 或衍生形式的此类重组载体，可采用特别是 US 6,162,620，

US 5,866,383，US 5,552,143 或 WO 9639491 中描述的方法。gH 蛋白也可由通过连续送过细胞培养物而减毒的 CMV 的株，特别是已经就疫苗目的试验过的 Towne 株提供。

作为疫苗抗原，也可以使用一种由 gB 糖蛋白或 gH 糖蛋白（或从所述糖蛋白剪取的形式）与 HSV1 或 HSV2（或从其剪取的形式）之间的融合生成的蛋白。例如，可举出 EP 0759995 中描述的融合蛋白，特别是 gB 685*和由部分 CMV gB 糖蛋白与部分 HSV gD 糖蛋白之间的融合生成的 gB 685**。

视 CMV 抗原本质而定，疫苗组合物可采取各种不同的形式:

- 当抗原是蛋白或肽时，疫苗组合物可呈 O/W 乳液的或热可逆 O/W 乳液的混合物的形式。它也可呈临服用前配制的临时制剂的形式。疫苗组合物也可被置于装置内，如置于将抗原与乳液物理地分开的“旁路”针筒内。

- 当 CMV 抗原呈表达 gB、gH 或由 gB 或 gH 衍生的肽的重组病毒形式时，或者当它呈 CMV 的减毒株时，则抗原和本发明乳液通常不在疫苗组合物中直接接触。该抗原和乳液可置于将它们物理地分开的装置中，例如，“旁路”针筒，但它们将在给药的同一现场同时地给药。

本发明乳液还通过促进 Th1 型细胞因子（IL2，IFN-γ等）的生产和/或通过减少 Th2 型细胞因子（IL4，IL5，IL10 等）的生产以应答在 MHC 类别 II 前后序列中呈递的抗原，而使特异 CD4+细胞应答倾向于 Th1 的特质（profile）。此种效应是通过测定以与用于体内免疫的相关的抗原重复体外刺激后产生的 IFN-γ和 IL5 数量，或通过确定 IFN-γ/IL5 比值来评估。该比值越高，CD4+应答越倾向于 Th1 型。CD4+T 细胞应答特质也可通过测定老鼠以本发明疫苗组合物免疫后获得的特异 Ig2a/特异 IgG1 之间的比值来间接评估。

因此，本发明乳液被用于纠正在某些表现出免疫缺损或免疫系统障碍个体的群体中观察到的 CD4+T 细胞应答失衡。这些人特别是那些在以源于细胞内微生物的抗原，特别是以流感抗原（Ouyang 等人（Mechanisms of ageing 和 development），2000，vol. 121，131-137）进行体外刺激后表现出 IFN-γ和/或 IL2 产生量不足的老年个体。

因此，本发明的主题是本发明乳液用于制备打算用于表现出 CD4+T 细胞应答失衡的个体的人群。

本发明的主题也是一种制备本发明 O/W 乳液的方法，包括通过提高温度获得 W/O 反相乳液的步骤，以及通过降低温度使 W/O 反相乳液转变为 O/W 乳液的步骤。该转变是在当获得的 W/O 乳液被降低到低于该乳液的相变温度的温度时发生的。

按照该方法的一种实施方案，W/O 乳液是通过实施将含有含水溶剂、聚氧乙烯烷基醚和 TLR4 兴奋剂的水相与含有角鲨烯和非离子疏水表面活性剂的油相混合从而获得 O/W 乳液的第一步骤，以及将 O/W 乳液加热至至少是乳液相变温度的温度的第二步骤获得的。

将含有水溶液（一般是缓冲液）、TLR4 兴奋剂（如果它不在油相中）和非离子亲水表面活性剂的水相加入到包含角鲨烯和非离子疏水表面活性剂的油相中，或者反过来：将油相加入到水相中。此种加入是在机械搅拌下进行的。获得一种未标定、不稳定的粗 O/W 乳液（预乳液）。该预乳液在机械搅拌下加热，直至达到相变，即，获得一种 W/O 乳液。相变可以由电导分析法跟踪。出现反映从一种类型乳液向另一种乳液转变的曲率改变的温度就是相变温度。实际上，该温度是一个温度范围，而不是非常具体的点值；事实上，可以认为，为了使整个乳液都发生相变，该温度能变动 1 或 2 度。当乳液处于 W/O 乳液时，观察到电导率的突然下降。停止加热并冷却该混合物。冷却可被动地进行，即通过简单地让温度自发地返回到环境温度，或者较积极地，通过，例如，将乳液浸没在冰浴中。在温度下降期间，W/O 乳液将在相变温度再次反转从而重又获得 O/W 乳液。该乳液在等待以含疫苗抗原的溶液稀释期间可原封不动地放置。它是热可逆的，就是说，如果它被再次提高到至少等于相变温度的温度，它将重新变成 W/O 乳液。相变温度通常介于 45～80℃，典型温度介于 50～65℃。于是，乳液的诸成分，特别是 TLR4 兴奋剂，将经受防止水相蒸发或成分的化学降解的适度加热。

按照另一种实施方案，这样制取 W/O 乳液，即：分别加热含有含水溶剂、聚氧乙烯烷基醚和 TLR4 兴奋剂的水相，以及含有角鲨烯和非离子疏水表面活性剂的油相，至至少等于乳液相变温度的温度，随后混合该水相与油相，与此同时保持混合物的温度处于至少等于相变温度的温度。

在此种情况中，水相和油相分别加热至略微高于相变温度的温度，然后混合它们以得到 W/O 反相乳液，后者接着将进行冷却，直至获得

亚微米 O/W 乳液。这些操作可在分开的容器中进行，以便间歇制备。

也可以使用“在线”制造方法。该方法包括在热条件下通过恒温调节的静态混合器混合分别制备的水相和油相，随后通过连接静态混合器出口的、制冷的热交换器进行在线冷却，然后在适当接收器（烧瓶或反应器）中最终回收本发明乳液。一种静态混合器已被成功地应用，它由一系列混合元件组成，该元件由相对于装有它们的管子的轴线倾斜布置的十字形桨叶组成。混合所需要的能量由输送流体的泵提供，混合是在没有运动零件的情况下，通过混合元件，依靠混合物诸成分的相继分离、排代和汇合实现的。

在线制造方法按如下方式实施：水相和油相分别制备，如上所述，在 2 个烧瓶或反应器中。这两相在搅拌下加热至略微高于相变温度的温度。随后，这两相由 2 台泵引入到恒温调节的静态混合器中，其间调节泵的流率以便获得符合本发明的乳液组成。在这两相通过静态混合器期间便获得 W/O 反相乳液。然后，反相乳液借助在线流过连接静态混合器出口的制冷的热交换器被冷却。继而，该 W/O 乳液将通过制冷的热交换器而发生反转，从而生成 O/W 乳液，被收集在烧瓶或反应器中，其特性与利用间歇方法获得的乳液相同。

仍然存在作为上面已经描述的本发明的实施方案的替代方案；当 TLR4 兴奋剂的性质，与亲水相比，更偏于疏水时，它将被引入到油相，而不是水相。TLR4 兴奋剂也可在油相与水相已经实施混合之后，或者当乳液已加热并且它处于 W/O 乳液形式时，被引入。水相也可含有糖醇。最后，制备本发明乳液的方法还可包含几个前后连接的热转变循环。

本发明的目的是还在于一种制备疫苗组合物的方法，其中至少一种疫苗抗原与含有化学结构中不含糖环的 TLR4 兴奋剂进行混合，特征在于，含有该 TLR4 兴奋剂的 O/W 乳液按照相变方法制备，它包括通过提高温度得到 W/O 反相乳液形式的乳液的步骤，以及通过降低温度将 W/O 乳液转变为 O/W 乳液的步骤。

一种简单实施方案包括将疫苗抗原水溶液混入到按照刚才描述的实施方案之一获得的热可逆 O/W 乳液中。获得的疫苗组合物呈 O/W 乳液的形式，或呈热可逆 O/W 乳液的形式，这是指当角鲨烯的数量代表疫苗组合物总重量的至少 5 wt%时。替代地，抗原可在制备乳液之前与水相或油相进行混合。当然，这样实施该程序意味着，这些抗原是与热

转变方法相容的抗原。抗原溶液还可包含无机盐和1或多种缓冲剂，还有任何其他通常用于疫苗的化合物，例如，稳定剂、防腐剂或任选地，其他佐剂。仅作为说明，水溶液中的抗原浓度一般介于1 μg/ml ~ 1 mg/ml之间。

本发明方法还可包括冷冻干燥步骤。首先，制备浓缩液态乳液，正如上面描述的那样，但优选的是选择水而不是缓冲液作为水溶液。该乳液随后被稀释在含有糖醇、糖和烷基聚苷的冷冻干燥底物中。通常使用的冷冻干燥底物包含甘露醇、蔗糖和十二烷基麦芽苷。随后，将稀释的乳液分成一份份样品（例如，0.5 mL）并可接受按照以下方式实施的冷冻干燥循环:

- 在+4℃加载样品，
- 在-45℃的设定温度冷冻约2 h，
- 在0℃的设定温度一次干燥14 ~ 19 h，
- 在+25℃的设定温度二次干燥3 h又30 min。

获得的冷冻干燥物通常保存在+4℃左右的温度，直至与1或多种疫苗抗原混合。本发明疫苗组合物总重量于是可通过以抗原水溶液分散冷冻干燥的乳液来制备，并原封地保存（即，以液态），或者可进行进一步冷冻干燥循环的处理以便以冷冻干燥物的形式保存，如果抗原的本性允许这样。替代地，可以直接以包含疫苗抗原和糖醇、糖和烷基聚苷的水溶液稀释该浓缩的乳液，随后对获得的组合物实施冷冻干燥。此种实施该程序的方式，当然，隐含，抗原与冷冻干燥加工相容。

下面的例子以非限制性方式解释本发明各种不同的实施方案。

实施例I：含有32.4 wt%角鲨烯的浓缩热可逆O/W乳液的制备

一种18 wt%甘露醇在磷酸盐缓冲液中的溶液在40℃、机械搅拌下制成。0.093 g EumulginTM B1被加入到0.454 g该溶液中，后者在40℃、机械搅拌下均化5 min。

制备包含1000 μg/ml化学化合物ER804057在50 mM Tris缓冲液中的储备悬浮体。390 μl ER804057的储备悬浮体被加入到该Eumulgin™ B1/甘露醇混合物中。

在另一个接收器中，0.073 g Dehymuls™ SMO与0.484 g角鲨烯进行混合，然后，该混合物在30℃、机械搅拌下均化5 min。

随后，含 ER804057 的水相物料在 30℃、搅拌下被加入到含有 Dehymuls™ SMO/角鲨烯混合物的油相中。

获得的粗乳液在机械搅拌下加热，直至达到 60℃的温度。该温度对应于该组合物的相变温度。之后，乳液处于反相乳液的形式（W/O 乳液）。

然后，停止加热但维持搅拌直至温度达到实验室环境温度（≈20℃）。乳液变回到 O/W 乳液的形式。

于是获得均质热可逆 O/W 乳液，其中油滴总体的大于 90%（体积）的粒度≤200 nm，且其中重量组成如下：

32.4%角鲨烯，

6.2% ceteareth-12（Emulgin B1），

4.9%脱水山梨醇一油酸酯（dehymuls SMO），

5.5%甘露醇

0.026% ER804057.

角鲨烯在该佐剂乳液中的数量因此代表乳液总重量的 32.4 wt%。

在另一种实施方案中，在烧杯中制备含有 50.5 g 磷酸盐缓冲液，6 g 甘露醇，6.18 g Eumulgin™ B1 和 0.026 g ER804057 的混合物。该混合物在约 40℃维持搅拌。在另一个容器中制备油相：混合 32.5 g 角鲨烯与 4.8 g Dehymuls SMO，利用磁性搅拌，直至 Dehymuls SMO 完全溶解。当获得均质相时，将水相加入到油相中，并按如上所述先实施升温步骤，随后实施降温步骤。获得一种均质热可逆 O/W 乳液，其中大于油滴总体的 90%（体积）的粒度≤200 nm 且其中重量组成如下：

32.5%角鲨烯，

6.2% ceteareth-12（Emulgin B1），

4.8%脱水山梨醇一油酸酯（Dehymuls SMO），

6%甘露醇，

0.026% ER804057，

50.5% PBS。

在方法的另一种实施方案中，使用一种通过混合 0.83 mM 柠檬酸一水化物与 9.14 mM 柠檬酸钠制备的柠檬酸盐缓冲液，pH 6.04，以替代 PBS 缓冲液。

该浓缩角鲨烯乳液被用作“储备”乳液，由它，通过稀释在磷酸盐缓冲液、Tris 缓冲液或柠檬酸盐缓冲液中衍生出热可逆 O/W 乳液，随后

令其通过过滤灭菌（见实施例 II）。这些 O/W 乳液随后与 1 或多种疫苗抗原进行混合（参见实施例 III、IV 和 V）。

实施例 II: 含有 5 wt%角鲨烯的稀热可逆 O/W 乳液的稳定性研究

实施例 1 的浓缩乳液被稀释在 9.6 mM 磷酸盐缓冲液（pH=7.4）中从而获得稀乳液，其中角鲨烯的数量代表乳液总重量的 5 wt%。稀乳液被称作 5% PIT-ER804057，其组成如下：

角鲨烯：50 mg/ml

ceteareth-12（Emulgin B1）：9.5 mg/ml

脱水山梨醇一油酸酯（dehymuls SMO）：7.4 mg/ml

甘露醇：9 mg/ml

ER804057：40 μg/ml

在+4℃贮存 6 个月后，对该热可逆乳液的稳定性通过确认 ER804057 在乳液中的含量以及乳液液滴分布进行评估。为测定 ER804057，实施 ER804057 从乳液中的选择性萃取，随后进行偶联到二极管阵列检测器（紫外检测）上的高性能液相色谱法（HPLC）的分析。待确认乳液的 ER804057 的含量是采用含有 5～25 μg/ml ER804057 的标准范围测定的。为补偿萃取收率的波动，在每个待测样品中引入化学结构非常接近 ER804057 的恒定数量内标（加入到标准范围的样品中），该内标是叫做 ER803022 的化学分子。

“标准范围”是这样制备的：取组成和制备方法与 5%的 PIT-ER804057 乳液（参见实施例 II）相同的热可逆乳液，只是它不含任何 ER804057（乳液 PIT，5%），向其中加入不同数量取自 ER804057 储备溶液的 ER804057，按 0.1 mg/ml 含 2 体积氯仿/1 体积甲醇的混合物（混合物 CM 2:1），以及固定数量内标（10 μg），后者按 0.1 mg/ml 混合物 CM 2:1 取自内标储备溶液，将它酌情稀释在水中以便配成可注射制剂（EPPI）。

该 5%的 PIT-ER804057 待测样品是通过取 5%乳液 PIT-ER804057 等分试样，向其中加入 10 μg 内标并在水中稀释成可注射制剂而制成的。

ER804057 从标准范围样品或从 5% PIT-ER804057 样品中的萃取按如下方式实施：样品用 CM 2:1 增溶。获得的两相体系由主要含有 ER804057 的氯仿相和含有乳液其他成分的水相组成。氯仿相在热条件和氮气流下被回收并蒸发。获得的干萃取物重新被增溶在 CM 2:1 混合

物中。将混合物加载到预先在 CM 2:1 中平衡过的阴离子交换元件上去。它选择地截留带负电的 ER804057 和内标，而乳液的其他成分，由于不带电，被排出。ER804057 和内标利用含 2 体积氯仿和 3 体积甲醇，每体积 1M 氯化钠的混合物洗脱。随后，洗脱液在热条件、氮气流下进行干燥。最后，用水和 CM 2:1 进行最终萃取以便除掉残余盐并在氯仿相中回收到 ER804057 和内标，它们最后在热条件、氮气流下进行蒸发。由每种样品衍生的干萃取物被保存在-20℃，直至用 HPLC 进行分析。

每个样品的干萃取物以 50 µl CM 4:1 增溶，随后在甲醇中稀释至 1/2，随后在 30%乙腈-水的混合物中稀释至 1/10，用于可注射制剂。20 µl 该稀液被注入到液相色谱法仪器（Merck Hitachi HPLC，Lachrom series 7000）中，其中装有 Waters XTerra™ RP8 柱，后者预先在由 80%相 A（50/50 用于可注射制剂的水/含 2% H_3PO_4 的乙醇）和 20%相 B（乙醇，含 2% H_3PO_4）组成的移动相中平衡过。ER804057 和内标被利用某种含 2% H_3PO_4 的乙醇的梯度洗脱。在 HPLC 的出口，洗脱液到达二极管阵列检测器，其分子在 215 nm 波长被检出。在获得的色谱图上，就 2 个峰值（分析物和参照物）的表面面积进行积分并校正。为校正与样品制备有关的波动，在对应于 ER 804057（被定量的分子）和 ER803022（内标）成对的峰值的表面面积之比，与对应于 ER 804057 和 ER803022（内标）的浓度比之间，制定出标准曲线。一旦曲线制定出来，存在于 5%乳液 PIT-ER804057 中的 ER804057 的数量便可通过测定 ER804057/内标峰值的表面面积之比并与标准曲线比较来确定。

	1 个月，+4℃	3 个月，+4℃	6 个月，+4℃
ER 804057（理论浓度 40 µg/ml）	38 µg/ml	37 µg/ml	42 µg/ml

上表所载数据显示，ER804057 保持了其结构完整性，而且其在乳液 5% PIT-ER804057 中的浓度，在乳液于+4℃保存 6 个月后未发生实质性改变。

采用 Mastersizer 2000，在将乳液稀释至 1/100 之后实施粒度分布分析，采用以下参数：IR 粒子=1.495；IR 介质=1.332；吸收值=0；朦胧下限（limite d'obscuration bass）=4%；朦胧上限（limite d'obscuration haute）

=7%; “通用”分析模型。就每一种粒度分布分析而言，评估了以下参数：d10，d50 和 d90，它们分别代表这样的数值，即，在这些数值以下分别存在着占油滴总体的 10%，50%和 90%的油滴。

	T=0	T=3 个月	T=6 个月
d10	71 nm	70 nm	70 nm
d50	103 nm	100 nm	101 nm
d90	155 nm	152 nm	153 nm

这些结果显示，乳液的粒度分布在+4℃经至少 6 个月的时间是稳定的。

实施例 III: 由本发明 O/W 乳液制备的抗细胞肥大病毒感染的疫苗组合物

制备了包含作为疫苗抗原的一种由 CMV 的 gB 糖蛋白衍生的重组蛋白的疫苗组合物。该重组蛋白是由以叫做 pPRgB27clv4 的质粒转染的重组 CHO 系制备的，它包含改性 gB 基因。为促进 CHO 系生产该重组蛋白的能力，对其序列描述在 US 5,834,307 中的 gB 基因预先做了改性，即，消除了记录着对应于位于缬氨酸 677 与精氨酸 752 之间的氨基酸序列的 gB 蛋白跨膜区域编码的那部分基因，并在切割位点引入 3 个点突变。由 CHO 系生产的蛋白，被称作 BdTM，对应于去掉切割位点和跨膜区域的修剪过的 gB 蛋白。

质粒 pPRgB27clv4 的建造和利用重组 CHO 系实现修剪 gB 蛋白（gBdTM）的制备描述在 US 6,100,064 中。随后，在该培养介质中生产的 gBdTM 蛋白采用 Rasmussen L 等人（J. Virol.（1985）55: 274-280）描述的亲和色谱法，用单克隆抗体 15D8 来提纯。提纯的蛋白以含有 0.975 mg/ml gBdTM 在磷酸盐缓冲液中的储备溶液形式贮存。

制备了用 gBdTM 并加上各种不同 O/W 乳液或氢氧化铝悬浮体配制的免疫刺激组合物。

组合物编号 1 含有在柠檬酸盐缓冲液中的 2 μg gBdTM，pH 6，50 μl（组 gB）。

组合物编号 2 含有 2 μg gBdTM，1.075 mg of 角鲨烯，0.133 mg 脱水山梨醇三油酸酯（Montane™ VG 85）和 0.125 mg of Tween™ 80，在

柠檬酸盐缓冲液中，pH 6，50 μl（组 gB+O/W 乳液）。该组合物是通过体积对体积混合 gB 的溶液与通过微流化获得的现有技术 O/W 乳液而获得的。

组合物编号 3 包含 2 μg gBdTM 和 60 μg 氢氧化铝，在磷酸盐缓冲液中，50 μl（组 gB+AL）。

组合物编号 4 包含 2 μg gB，1.25 mg 角鲨烯，0.187 mg Dehymuls™ SMO，0.237 mg Eumulgin™ B1 和 0.225 mg 甘露醇，在 PBS 缓冲液中，pH 7.4，50 μl。该组合物是通过体积对体积混合 gB 的溶液与含有 5%角鲨烯的热可逆 O/W 乳液获得的（组 gB+PIT）。用于制备该组合物的热可逆 O/W 乳液是通过稀释含有 32.4 wt%角鲨烯的浓缩热可逆 O/W 乳液获得的，后者是采用与实施例 1 中描述的方法相同的方法制备的，不同的是，水相不含任何 ER804057。

组合物编号 5 包含 2 μg gBdTM 和 1 μg ER804057，在柠檬酸盐缓冲液中，pH 6，50 μl（组 gB+ER804057）。

组合物编号 6 包含 2 μg gBdTM，1.25 mg 角鲨烯，0.145 mg Montane™ VG 85，0.147 mg Tween™ 80 和 1 μg ER804057，在柠檬酸盐缓冲液中，pH 6，50 μl（组 gB+O/W 乳液+ER804057）。该组合物是通过体积对体积混合 gB 的溶液与其中加入了 ER804057 的用微流化方法获得的现有技术 O/W 乳液而获得的。

组合物编号 7 含有 2 μg gBdTM，1 μg ER804057 和 60 μg 氢氧化铝，在磷酸盐缓冲液中，50 μl（组 gB+Al+ER804057）。

组合物编号 8 含有 2 μg gB，1.25 mg 角鲨烯，0.189 mg Dehymuls™ SMO，0.240 mg Eumulgin™ B1，0.211 mg 甘露醇和 1 μg ER804057，在 PBS 缓冲液中，pH 7.4，50 μl。该组合物是通过体积对体积混合 gB 的溶液与 5%角鲨烯的 PIT-ER804057 热可逆 O/W 乳液 PIT-ER804057 获得的，后者是通过稀释实施例 1 的储备乳液获得的（组 gB+PIT+ER804057）。

8 组 10 个 8 周大雌性远系繁殖 OF1 老鼠在日 D0 和 D21 接受以上面给出的组合物的皮下免疫注射（每组老鼠接受 2 次同样组合物的注射）。

在 D20 和 D34 从后眶窦（retro-orbital sinus）抽取的血样被用于测定 gBdTM-特异 IgG1 和 IgG2a 抗体的浓度。这些检测是按照 ELISA，通过在 Dynex 96-孔微量培养板的孔上涂布 100 ng（100 μl）gBdTM 在 0.05

M 碳酸盐缓冲液中，pH 9.6，并在+4℃过夜实施的。

为确定中和抗体，采用 Gonczol E.等人在 J. Virological Methods，14: 37-41（1986）中描述的程序。

采用在含有 10%胎儿牛犊血清的 MEM 介质中培养的 MRC5，在通道 28 至 38 之间用以进行微量中和试验。在 MRC5 细胞上提纯并繁殖的 Towne CMV 株(Wistar Institute，Philadelphia，US)，具有约 2 x 10^6 PFU/ml 的滴定度，被用作感染菌株。也使用一种由 Virion Ltd Institute（瑞士）获得的老鼠血清获得的补体源。一种滴定度为 1:128 的人体血清的混合物被用作阳性参照物并将其包括在每个微量中和化验中。

待测血清在 56℃加热 30 min 以灭活。在平底 96-孔微量培养板中，在每份 15 μl 等分试样中加入 105 μl 培养介质（MEM+10%胎儿牛犊血清）（1/8 稀释）。然后制备一系列 2 倍稀释液。按同样方式试验对照血清。在每一个孔中加入 60 μl 包含 3000 PFU 的病毒悬浮体和 5 μl 老鼠补体。在 37℃、CO_2 下培养 1 h 后，每个孔中加入 150 μl 培养介质中的 3-4 x 10^4 MRC5 个细胞。将微量培养物培养 4 日。在不含任何血清的孔中的病毒，其细胞致病活性是 100%。另一方面，在含有中和血清的孔中，观察到病毒的细胞致病活性受到抑制。血清的中和抗体滴定度对应于其稀释度的倒数，其抑制病毒的细胞致病活性大于 90%。

从每一组老鼠获得的结果载于下表:

老鼠组	IgG1，在 D20	IgG2a，在 D20	IgG1，在 D34	IgG2a，在 D34	在 D34，IgG1/IgG2a 比
组 gB	2.47*	2.09	3.80	2.94	137
组 gB+O/W 乳液	4.06	2.98	5.49	4.18	143
组 gB+AL	3.06	1.85	4.90	3.33	357
组 gB+PIT	4.61	3.91	5.61	4.85	14
组 gB+ER804057	3.09	3.12	4.43	4.16	6
组 gB+PIT/ER804057	4.78	4.58	5.83	5.74	3

*: 血清稀释液的平均滴定度（表示为 $\log_{10}$）

这些结果表明，PIT/ER804057 乳液表现出比其他佐剂更大的免疫刺

激能力，因为在老鼠的“gB+PIT/ER804057”组中获得的特异 IgG1 和 IgG2a 滴定度显著高于在老鼠“gB+AL”或“gB+O/W 乳液”组中获得的那些。本发明乳液的免疫刺激能力不仅是由于热可逆乳液（PIT 乳液）或 TLA4 兴奋剂造成的，而且由于这两种产物的组合所致。事实上，在“gB+PIT”和“gB+ER804057”组中观察到的特异 IgG1 和 IgG2a 滴定度显著低于在“gB+PIT/ER804057”组中观察到的那些。

中和抗体生产的汇总表

老鼠组	中和抗体滴定度
组 gB	16**
组 gB+O/W 乳液	32
组 gB+AL	32
组 gB+PIT	48
组 gB+ER804057	16
组 gB+O/W emulsion H/E+ER804057	32
组 gB+AL+ER804057	32
组 gB+PIT+ER804057	128

**：抑制病毒的细胞致病效应超过 90%的血清稀释度平均值的倒数。

这些结果显示，由 CMV 包膜抗原与含本发明中描述的 TLR4 兴奋剂的热可逆 O/W 乳液的混合产生的免疫刺激组合物是能在老鼠体内诱导最高中和抗体滴定度的组合物。PIT/ER804057 乳液刺激中和抗体生产的能力大于其他试验过的佐剂组合物。PIT/ER804057 乳液，据发现，比含有与 MF59 乳液相同成分的、迄今被认为是辅佐 CMV 蛋白的标准佐剂的基于角鲨烯的 O/W 乳液更有效（就其刺激中和抗体的生产而论）。还应当指出，TLR4 兴奋剂在现有技术 O/W 乳液中的加入不增加该乳液的有效性（中和抗体滴定度依然不变），然而热可逆乳液（PIT）的有效性，当它包含 TLR4 兴奋剂时，却增加了（中和抗体滴定度增加）。

实施例 IV：由本发明 O/W 乳液制备的抗流感免疫组合物

免疫刺激组合物由包含 3 种 2004 campaign（战役）疫苗株（the A/New Caledonia（H1N1）株，the A/Wyoming（H3N2）株，和 the B/Jiangsu 株）的抗流感疫苗组合物制备，它是用各种不同 O/W 乳液组合物或用氢氧

化铝悬浮体配制的。

组合物编号 1 含有每种病毒株 0.3 μg 凝血素（HA），在 PBS 缓冲液中，30 μl（0.3 μg HA 组）。

组合物编号 2 含有每种病毒株 6.3 μg 凝血素（HA），在 PBS 中，30 μl（6.3 μg HA 组）。

组合物编号 3 含有每种病毒株 0.3 μg 凝血素（HA），0.65 mg 角鲨烯，0.075 mg 脱水山梨醇三油酸酯（Span™ 85）和 0.075 mg Tween™ 80，在 PBS 缓冲液中，30 μl（0.3 μg HA+O/W 乳液组）。该组合物是通过混合抗流感疫苗组合物与通过微流化获得的现有技术 O/W 乳液获得的。

组合物编号 4 含有每种病毒株 0.3 μg 凝血素（HA），0.75 mg 角鲨烯，0.11 mg Dehymuls™ SMO，0.143 mg Eumulgin™ B1 和 0.138 mg 甘露醇和 0.6 μg ER804057，在 PBS 缓冲液中，pH 7.4，30 μl（0.3 μg HA+PIT/ER804057 组）。该组合物是通过混合抗流感疫苗组合物与实施例 1 中描述并预先用 PBS 缓冲液稀释过的热可逆乳液而获得的。

4 组 8 个 8 周大雌性 BALB/c 老鼠通过皮内给药（耳朵内表面）在 D0，以 30 μl 剂量上面给出的免疫刺激组合物之一接受免疫。

在 D20 从后眶窦抽取的血样被用于测定在每组免疫过的老鼠中得到的对每种病毒株特异的中和抗体的滴定度（凝血素-抑制（HAI）抗体）。该检测的原理基于病毒使红血细胞凝集的能力，而包含专门抗该病毒的 HA 的中和抗体的血清则能抑制病毒的“凝血”活性。首先，将血清中包含的非特异抑制因子通过以 Sigma 提供的 RDE 酶（消灭酶的受体）处理血清，随后令它们与 10%鸡血红细胞溶液进行接触而将它们（非特异因子）消除。获得一种不含非特异抑制因子并且对应于稀释至 1/10 的上层清液。随后，制备一系列上层清液在磷酸盐缓冲液中的 2 倍稀释液，随后将 50 μl 每种稀释液沉积到 V 形底微量板的孔中。在每个孔中加入 50 μl 来源于滴定度为 4 凝血单位（4HAU）的澄清尿囊酸流体的病毒悬浮体。该板在实验室温度下孵化 1 h，随后在每个孔中加入 50 μl 鸡或火鸡血红细胞。让板在+4℃静置 1 h，然后读取化验读数。凝血抑制因子的存在反映在微量孔底部红斑的存在上，而凝血作用的存在则反映在在孔中发粉红色的光圈的存在上。HAI 抗体滴定度由在微量板孔中不再看到凝血现象的最终稀释的逆转代表。

获得的结果载于下表：

老鼠组	HAI，抗 A/New Caledonia（H1N1）	HAI，抗 A/Wyoming（H3N2）	HAI，抗 B/Jiangsu
0.3 μg HA	26***	174	8
6.3 μg HA	247	907	73
0.3μg HA+O/W 乳液	135	987	57
0.3μg HA+PIT+ER804057	290	1522	98

***：从每组老鼠 8 个血清样获得的 HAI 滴定度的平均值。

这些结果显示，通过混合流感疫苗与含有 TLR4 兴奋剂的热可逆 O/W 乳液而获得的疫苗组合物是，与其他疫苗组合物相比，在老鼠体内诱导最高中和抗体滴定度的组合物，不论测试何种疫苗株。PIT/ER804057 乳液，据发现，甚至比组成类似于 MF59 的现有技术 O/W 乳液还稍微更有效（就其刺激中和抗体生产而论）。该组合物的优点还在于，抗原的数量可以大大减少，因为用 0.3 μg 血凝素的剂量与 PIT/ER804057 乳液混合所获得的结果好于用等于或大于 20 倍凝血素剂量获得的那些。

在另一种试验中，针对以由同样来自 2004 campaign 的疫苗制备的各种不同免疫刺激组合物所免疫的老鼠组，跟踪了凝血素-抑制抗体滴定度随时间的演变。

组合物编号 1 含有每种病毒株 0.3 μg 凝血素（HA），在 PBS 缓冲液中，30 μl（0.3 μg HA 组）。

组合物编号 2 含有每种病毒株 6.3 μg 凝血素（HA），在 PBS 缓冲液中，30 μl（6.3 μg HA 组）。

组合物编号 3 含有每种病毒株 0.3 μg 凝血素（HA），和 0.6 μg ER804057，在缓冲水溶液中，30 μl（0.3 μg HA+ER804057 组）。

组合物编号 4 含有每种病毒株 0.3 μg 凝血素（HA），0.30 mg 角鲨烯，0.044 mg Dehymuls™ SMO，0.057 mg Eumulgin™ B1 和 0.055 mg 甘露醇，在 PBS 缓冲液中，pH 7.4，30 μl（0.3 μg HA+PIT，1%组）。

组合物编号 5 含有每种病毒株 0.3 μg 凝血素（HA），0.30 mg 角鲨烯，0.044 mg Dehymuls™ SMO，0.057 mg Eumulgin™ B1，0.055 mg 甘

露醇和 0.6 μg ER804057，在 PBS 缓冲液中，pH 7.4，30 μl（0.3 μg HA+PIT at 1%+ER804057 组）。

5 组 5 个 8 周大雌性 BALB/c 老鼠通过皮内给药（耳朵内表面）在 D0，以 30 μl 剂量上面给出的免疫刺激组合物之一接受免疫。

在 D23、D51 和 D79 从后眶窦抽取的血样被用于测定在每组被免疫老鼠中得到的对 HIN1 株特异的中和抗体的滴定度（凝血素-抑制（HAI）抗体）。获得的结果载于下表。

老鼠组	D23	D51	D79
0.3 μg HA 组	35***	53	80
6.3 μg HA 组	235	243	279
0.3 μg HA+ER804057 组	65	211	243
0.3 μg HA+PIT，1%组	226	557	735
0.3 μg HA+PIT，1%+ER804057 组	226	970	844

***：从每组老鼠 5 个血清样品获得的 HAI 滴定度平均值。

PIT-ER804057 乳液就其生产流感病毒凝血-抑制抗体（保护性抗体）的能力而论的有效性是乳液与 TLR4 兴奋剂共同作用的结果，单单 PIT 乳液或者单单 ER804057 效力都较小。

实施例 V：在已经对流感病毒敏化的年幼或年老老鼠群体中试验的由本发明乳液制备的抗流感疫苗组合物

本发明乳液的抗流感疫苗有效性在已经对流感病毒敏化的个体给药的病例中进行了试验，敏化或者是因为个体曾经接触过抗流感病毒或者因为它们已经接种了抗流感疫苗。

为实施此种评估，可使用已用三价疫苗做了肌肉注射（IM）预先免疫的老鼠，按照 Potter 等人（Vaccine，2003，21：940-945），作为相对于流感而言不是首次经历的动物模型。

5 组 10 个 C57Bl/6 老鼠 8-10 周大，接受 IM 注射：三价疫苗的剂量包含 1.5 μg A/New Caledonia/20/99（H1N1），A/New York/55/04（H3N2）和 B/Malaysia/2506/04 株每种的 HA。

在 D28，除接受 PBS 缓冲液注射的 1 组（PBS 组）之外，所有其他老鼠组一律接受皮下注射：30 μl 体积各种不同疫苗组合物，包含不同于

一次免疫试验的三价疫苗（A/New Caledonia/20/99（H1N1），A/Wellington/01/04（H3N2）和B/Jiangsu/10/03）。

一组接受含有0.3 μg HA每种菌株在PBS缓冲液中的组合物(0.3 μg HA组）。

另一组接受含6.3 μg HA每种菌株在PBS缓冲液中的组合物(6.3 μg HA组）。

另一组接受含每种菌株0.3 μg HA，在PBS缓冲液中，在1%角鲨烯O/W乳液中的组合物，乳液包含0.3 mg角鲨烯，0.044 mg Dehymuls™ SMO，0.057 mg Eumulgin™ B1和0.055 mg甘露醇，在PBS缓冲液中。含有1%角鲨烯的该组合物是通过混合抗流感疫苗与O/W乳液制备的，该乳液是通过稀释浓缩的热可逆储备溶液获得的，后者是按照与实施例1中描述的相同方法制备的，所不同的是，水相不含任何ER804057(0.3 μg HA+PIT 1%组）。

最后，最后一组接受以下组合物的接种：它含每种菌株0.3 μg HA，在PBS缓冲液中，在1%角鲨烯O/W乳液中，乳液包含0.3 mg角鲨烯，0.44 mg Dehymuls™ SMO，0.057 mg Eumulgin™ B1和0.055 mg甘露醇，在PBS缓冲液中和0.6 μg ER804057。包含1%角鲨烯和0.6 μg ER804057的该组合物是通过混合流感疫苗与O/W乳液制备的，乳液是通过稀释浓缩的热可逆储备溶液获得的，储备溶液是按照实施例1所述相同方法制备的（0.3 μg HA+PIT 1%/ER 804057组）。

在D50，老鼠借助安乐死被处死，以便收集血样和采集脾脏样品。

对每种血样以A/New Caldedonia/20/99(H1N1)，A/Wellington/01/04（H3N2）和B/Jiangsu/10/03株实施了HAI试验。获得的结果载于下表：

老鼠组	HAI，抗A/New Caledonia（H1N1）	HAI，抗A/Wellington（H3N2）	HAI，抗B/Jiangsu
PBS组	52*	48	13
0.3 μg HA组	95	226	57
6.3 μg HA组	190	640	226
0.3 μg HA+PIT 1%组	431	640	290

0.3 μg HA+PIT 1%/ER804057 组	698	2348	640

*代表从每组老鼠的 10 个血清样品获得的 HAI 滴定度平均值。

这些结果显示，以含低剂量角鲨烯（1%）和 TLR4 兴奋剂（它包 0.6 μg ER804057）的“HA+PIT 1%/ER804057”疫苗组合物免疫的老鼠组中平均 HAI 滴定度明显高于老鼠以不含佐剂的流感疫苗在等价剂量 HA（0.3 μg HA 组）或 20 倍高的剂量（6.3 μg HA 组）之下免疫后获得的滴定度。这些结果显示，PIT 1%/ER 804057 乳液的优越性，即便在已经对流感病毒敏化的群体中，因为每种菌株的抗原数量可减少为 20 分之一，同时却获得，就 3 种病毒株而言，更高保护性抗体滴定度。

对每种脾脏样品分析了特异细胞免疫应答，采用 ELISPOT 技术和 CBA（Cytometric Bead Array）技术检验特异刺激后脾细胞产生的干扰素-γ和 IL5。

关于 ELISPOT 技术，2×10^5 脾细胞在 200 μl 培养介质（RPMI 1640，10%胎儿牛犊血清，2 mM 谷氨酰胺，50 mM β-巯基乙醇）中，被沉积在以（Pharmingen ref: 551216）或以大鼠抗鼠抗体 IL5 抗体（Pharmingen ref: 554393）预敏化的硝基纤维素微量板孔上。脾细胞在 37℃在鼠科 IL-2（Bohringer）（10 U/ml）和各种不同抗原以 1 μg/ml 的浓度的存在下进行孵化。为对 CD8+细胞应答进行分析，采用一种在 H-2kd 前后序列中公认的流感 NP 肽（TYQRTRALV）。为分析 CD4+细胞应答，流感抗原由以含有 A/New Caledonia/20/99（H1N1），A/Wellington/01/04（H3N2）和 B/Jiangsu/10/03 病毒株的三价灭活裂解疫苗代表。然后，洗净微量板，并用分泌 IFNγ或 IL5 的脾细胞利用生物素酰化的大鼠抗鼠 INFr 抗体（Pharmingen ref: 554410 或生物素酰化）的大鼠抗鼠 IL5 抗体（Pharmingen ref: 554393）和利用过氧化物酶-共轭的链霉亲和素（Southern Biotechnology-ref 7100-05）进行检测。在采用 3-氨基-9-乙基咔唑揭露后，利用自动 ELISPOT 读入器累加对应于分泌 IFNγ 或 IL5 的脾细胞的斑点。结果表示为每 10^6 个脾细胞分泌 IFNγ 或 IL5 的细胞数目。阳性检测门限值是 20 个斑点/10^6 脾细胞。

关于 CBA 技术，4×10^5 脾细胞在 200 μl 培养介质（RPMI 1640，10%胎儿牛犊血清，2 mM 谷氨酰胺，50 mM β巯基乙醇）中，被沉积在培养微量板的孔中。脾细胞在三价疫苗（1 μg/ml）的存在下或在没有刺激

剂的存在下在37℃孵化5日，以便评估细胞因子（介质对照样）的非特异生产。随后利用流动细胞计量术采用鼠 Th1/Th2 CBA 套件（Becton Dickinson-ref: 551287）化验培养物上层清液的IFNγ序列或IL5序列内容。阳性检测门限值是：就IFNγ而言2.5 pg/ml，和对IL5而言5 pg/ml。就每个大鼠样品而言，通过从结果中扣除非特异性产生的 IFNγ 或 IL5 的数量计算出IFNγ或IL5的特异浓度。

细胞应答分析的结果载于下表：

老鼠组	脾细胞数目，分泌IFNγ	脾细胞数目，分泌IL5	IFNγ的数量，在培养物上层清液中	IL5的数量，在培养物上层清液中	IFNγ/IL5比值
PBS	19*	23*	148**	355**	2.1***
0.3 μg HA	17	66	295	400	1.3
6.3 μg HA	30	13	780	523	
0.3 μg HA+PIT 1%	31	74	691	1301	0.6
0.3 μg HA+PIT 1%/ER 804057	66	22	1499	640	4.1

* 代表以三价疫苗刺激后，分泌IL5或IFNγ每10^6脾细胞的平均脾细胞数目。该平均值是根据从10个大鼠样品/老鼠组获得的ELISPOT结果算出的。

** 代表根据10个大鼠样品/老鼠组采用CBA技术获得的结构算出的IL5或IFNγ平均数量（pg/ml）。

*** 该比值代表每组中IFNγ/IL5比值的算术平均值。IFNγ/IL5比值是根据按照CBA方法在脾细胞经过培养后获得的IFNγ和IL5特异浓度值就每个样品确定的，随后算出每个老鼠组的10个比值的算术平均值。

这些结果显示，PIT 1%/ER804057乳液在以流感疫苗特异再刺激细胞后强烈促使CD4+细胞应答倾向于产生IFNγ。最显著的Th1应答（最高IFNγ/IL5比值）据发现存在于接受了该乳液的老鼠组中。Th1应答事实上强于接受了含20倍高剂量（6.3 μg组）的流感疫苗的老鼠组中的。因此，该乳液应推荐给在流感疫苗接种后Th1应答不良的个体，特别是老年个体的群体使用。

同样的试验程序采用 17 个月大雄性 C57Bl6 老鼠进行重复试验，随后测定抗 A/Wellington（H3N2）的 HAI 的滴定度。获得的结果载于下表。

老鼠组	HAIs，抗 A/Wellington（H3N2）
6.3 μg HA 组	104*
0.3 μg HA+PIT 1%组	247
0.3 μg HA+PIT 1%/ER804057 组	476

* 代表从每个老鼠组的 10 个血清样品获得的 HAI 滴定度平均值。

这些结果显示通过将抗流感疫苗混合在含有低剂量角鲨烯（1%）和 TLR4 兴奋剂（ER804057，0.6 μg）中获得的疫苗组合物中用于给已经对流感病毒敏化的老年个体的群体免疫接种的优点，因为每株流感抗原的数量可减少为 1/20，同时具有对 3 种病毒株较高的保护性抗体滴定度。